

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie
Campus Berlin Buch
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prognostische Bedeutung des p53/Bax/p16^{INK4a}-Signalwegs
bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Schelwies

aus Stuttgart Bad Cannstatt

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. Daniel

2. Prof. Dr. R. Greil

3. Prof. Dr. rer. nat. S. Wesselborg

Datum der Promotion: 19.11.2004

Zusammenfassung

Die Dysregulation von Zelltod-Signalwegen ist häufig bei malignen Tumoren. Inaktivierung von Apoptose-Signalwegen und gleichzeitige Unterbrechung der Zellzyklusregulation bestimmen nicht nur die Tumorentstehung, sondern auch intrinsische und erworbene Therapieresistenz sowie die Prognose der Erkrankung. Das Ziel dieser Studie war daher, den prognostischen Wert der Bax- und p16^{INK4a}-Proteinexpression in Korrelation zum Mutationsstatus des p53-Tumorsuppressorgens in einem Kollektiv von primären kolorektalen Adenokarzinomen zu analysieren.

Methoden: Die retrospektive Analyse wurde an 116 Patienten durchgeführt, welche in kurativer Intention an einem kolorektalen Karzinom (CRC) operiert und für ein Minimum von 5 Jahren oder bis zum Tod nachbeobachtet worden waren (UICC Stadium III: 59 Patienten; UICC Stadium IV: 57 Patienten). Die Profile der Bax- und p16^{INK4a}-Proteinexpression wurden mittels Immunhistochemie, die Bindungsdomäne des p53-Gens (Exon 5 - 8) mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-PCR auf Mutationen untersucht. Die gewonnenen Daten wurden mit klinisch-pathologischen Daten korreliert und statistisch analysiert.

Ergebnisse: Das mediane Gesamtüberleben betrug 17 Monate. Wie zu erwarten, lebten die Patienten mit Stadium III-Tumoren länger als Patienten im fortgeschrittenen Stadium IV: 69 vs. acht Monate ($p < 0,0001$). Stadium III-Tumore mit schwacher Bax-Expression waren mit einem signifikant ungünstigeren Überleben assoziiert als Tumore mit starker Bax-Expression ($p = 0,009$). p53-Mutationen oder p16^{INK4a}-Expression hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die kombinierte Analyse des p53/Bax-Signalwegs für Stadium III-Tumore zeigte den ungünstigsten Verlauf für Patienten mit defektem Signalweg (p53 mutiert/Bax schwach; $p = 0,004$). Im Gegensatz dazu hatte der p53/Bax-Status in Stadium IV-Tumoren keine Bedeutung für das Überleben.

Schlussfolgerung: Die Unterbrechung des p53/Bax-Signalwegs in primären kolorektalen Adenokarzinomen ist ein unabhängiger prognostisch ungünstiger Faktor nach kurativer R₀-Resektion von Stadium III-Tumoren. Die Unterbrechung des p53/Bax-Signalwegs könnte zur Identifikation von Patientengruppen mit hohem Risiko beitragen, welche in der Zukunft von Risiko adaptierten adjuvanten Therapien profitieren könnten.

Schlagwörter: Apoptose, Bax, p53, Prognose

Abstract

Deregulation of cell death pathways is a frequent event in cancer. Inactivation of apoptosis pathways in concert with disruption of cell cycle regulation not only contributes to tumor development and the clinical course of cancer disease but also determines intrinsic and acquired resistance to cancer therapy and disease prognosis. Therefore, the purpose of this study was to analyse the prognostic value of Bax and p16^{INK4a} protein expression in correlation to the mutational status of the p53 tumorsuppressor gene in primary colorectal adenocarcinoma.

Methods: Retrospective analysis was performed in a cohort of 116 patients undergoing surgery for colorectal adenocarcinoma (CRC) with curative intention. Patients were followed-up for a minimum of five years or until death (UICC Stage III: 59 patients, UICC Stage IV: 57 patients). Protein expression profiles of Bax and p16^{INK4a} were analysed by immunohistochemistry, the binding-domaine of the p53-gene (exon 5 - 8) was screened for mutations by Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP)-PCR. Data was correlated with clinical and pathological parameters and analysed statistically.

Results: Overall median survival was 17 months. As expected, patients with stage III malignancies survived longer than stage IV patients: 69 months vs. 8 months ($p < 0,0001$). Stage III tumors with high Bax expression were associated with a significantly better prognosis than Bax low expressing tumors ($p = 0,009$). p53-mutational status or p16^{INK4a}-expression was of no significance for overall survival. Combined analysis of p53/Bax pathway analysis for stage III carcinomas revealed the worst outcome for patients with a disrupted pathway (mutated p53/Bax low; $p = 0,004$). In contrast no significant effect of the p53/Bax status was found in stage IV tumors.

Conclusions: Disruption of the p53/Bax pathway, i.e. low Bax expression in primary colorectal adenocarcinoma is an independent negative prognostic factor after curative R₀-resection in stage III patients. Furthermore the prognostic power of a disrupted p53/Bax pathway may be helpful to define subgroups of patients at high risk who may benefit from risk-adapted adjuvant therapies in the future.

Keywords: apoptosis, bax, p53, prognosis

1	EINLEITUNG	7
1.1	MOLEKULARGENETIK UND PATHOGENESE	8
1.1.1	Genese des sporadischen Adenokarzinoms	8
1.1.2	Genese des hereditären Adenokarzinoms	10
1.2	KLINIK UND DIAGNOSTIK DES CRC	11
1.3	STADIENEINTEILUNG	12
1.4	PROGNOSE.....	14
1.5	THERAPIE DES CRC IM STADIUM III UND IV.....	15
1.5.1	Adjuvante Therapie.....	15
1.5.1.1	Kolonkarzinom	15
1.5.1.2	Rektumkarzinom	16
1.5.2	Palliative Therapie	17
1.6	APOPTOSE- UND ZELLZYKLUSREGULATION.....	19
1.6.1	Apoptosesignalwege.....	19
1.6.2	Zellzyklusregulation	23
1.6.3	Zellzyklus und Apoptose.....	26
1.6.4	Inaktivierung von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren in Tumoren.....	28
1.6.4.1	p53 reguliert Apoptose- und Zellzyklussignalwege	29
1.6.4.2	Bax ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie	31
1.6.4.3	p16 ^{INK4a} hemmt die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK 4/6	33
1.7	FRAGESTELLUNG	34
2	MATERIAL UND METHODEN.....	35
2.1	PATIENTEN UND TUMORGEWEBE	35
2.2	METHODEN.....	36
2.2.1	Übersicht.....	36
2.2.2	Präparation der genomischen DNA.....	37
2.2.3	Amplifikation der p53-Bindungsdomäne (Exon 5-8).....	38
2.2.4	Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	39
2.2.5	Immunhistochemische Färbung.....	41
2.2.6	Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung	43
2.2.7	Statistische Analyse.....	44
2.3	GERÄTE, ZUBEHÖR UND REAGENZIEN	45
2.3.1	Geräte und Zubehör	45
2.3.2	Reagenzien.....	46
2.3.3	Puffer	47
2.3.3.1	Kits.....	47
2.3.4	Enzyme und Nukleotide.....	48
2.3.5	Antikörper und Zelllinien	48
2.3.6	Computersoftware	48

3	ERGEBNISSE	49
3.1	FOLLOW UP	49
3.2	ANALYSE DER P53-MUTATIONEN	50
3.3	ANALYSE DER BAX-EXPRESSION	51
3.4	ANALYSE DER P16 ^{INK4a} -EXPRESSION	53
3.5	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN P53-MUTATIONEN UND BAX-EXPRESSION.....	56
3.6	EINFLUSS VON P53, BAX UND P16 ^{INK4a} AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN	57
3.6.1	p53-Mutationsstatus und Gesamtüberleben.....	57
3.6.2	Bax-Expression und Gesamtüberleben	58
3.6.3	p53/Bax-Status und Gesamtüberleben	58
3.6.4	p16 ^{INK4a} -Expression und Gesamtüberleben	60
3.6.5	p53/p16 ^{INK4a} -Status und Gesamtüberleben	61
3.6.6	Bax/p16 ^{INK4a} -Status und Gesamtüberleben.....	62
3.6.7	Uni- und Multivariate Regressionsanalyse	62
4	DISKUSSION.....	65
4.1	PROGNOSTISCHE RELEVANZ VON APOPTOSE- UND ZELLZYKLUS- REGULATOREN FÜR CRC	65
4.1.1	p53-Mutationen sind für die Prognose nicht entscheidend	65
4.1.2	Verminderte Bax-Expression korreliert mit schlechter Prognose	67
4.1.3	Der p53/Bax-Signalweg ist von prognostischer Relevanz.....	69
4.1.4	p16 ^{INK4a} ist kein unabhängiger Prognosefaktor für das CRC	70
4.1.5	p53-Status, Bax- und p16 ^{INK4a} -Expression sind keine Prognosefaktoren im Stadium IV	72
4.1.6	Repräsentativität der Stichprobe	73
4.2	RELEVANZ DER APOPTOSE- UND ZELLZYKLUSREGULATION FÜR DIE THERAPIE MALIGNER TUMORE	74
4.2.1	TNM-Klassifikation	74
4.2.2	Apoptosesignaldefekte und Therapieresistenz.....	75
4.3	SCHLUSSFOLGERUNG	78
	LITERATURVERZEICHNIS	79
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	93
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	95

1 Einleitung

Das Karzinom des Kolorektums (CRC) ist die häufigste maligne Krebserkrankung des Gastrointestinaltraktes und eine der häufigsten Krebserkrankungen in Nordamerika und Europa. Mit 57000 Neuerkrankungen im Jahr 1997 stellt es nach dem Mammakarzinom das zweithäufigste Malignom der Frau und das dritthäufigste des Mannes nach Prostata- und Lungenkarzinom dar (**Abb. 1**) (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Prozentuale Anteile der häufigsten Krebslokalisationen an der Gesamtzahl 1997 im Saarland

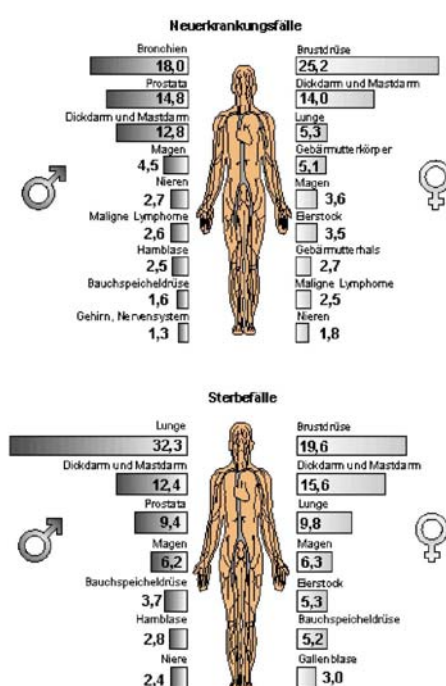


Abbildung 1: Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1997 im Saarland

Bei den bevorzugt im Sigma und Rektum auftretenden Karzinomen (**Tab. 1**) handelt es sich in 90 - 95 % der Fälle um Adenokarzinome, die sich aus gutartigen Adenomen entwickeln. Als Risikofaktoren für die maligne Transformation der Darmschleimhaut gelten eine positive Familienanamnese, langjährig bestehende chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie Diätfaktoren, die zu Veränderungen auf genetischer Ebene führen. In etwa 15 % liegt der malignen Entartung eine genetische Prädisposition zugrunde.

Tabelle 1: Anatomische Verteilung des kolorektalen Karzinoms (Schmoll et al., 1997)

Anatomische Verteilung	Häufigkeit
Zökum	14 %
Colon ascendens	10 %
Colon transversum	12 %
Colon descendens	7 %
Sigma	25 %
Rektosigmoidaler Übergang	9 %
Rektum	23 %

Durch verbesserte Maßnahmen der Früherkennung, Diagnostik und Therapie sowie der Einführung von Krebsfrüherkennungs- und Vorsorgeprogrammen konnte die Prognose verbessert und die Mortalität in den letzten 40 Jahren erheblich gesenkt werden. Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist weiterhin die Aufdeckung zellulärer und molekulargenetischer Mechanismen, welche Tumorentstehung, Biologie und Wachstumsverhalten bestimmen.

1.1 Molekulargenetik und Pathogenese

1.1.1 Genese des sporadischen Adenokarzinoms

Aus klinischen und histopathologischen Untersuchungen geht hervor, dass ca. 90 % der CRC sporadisch auftreten und sich fast ausschließlich aus gutartigen Adenomen entwickeln (Sugarbaker *et al.*, 1985). Es wird davon ausgegangen, dass luminale Faktoren, die hohe metabolische Aktivität der Darmflora und Tumor fördernde Metaboliten mit in den Darm gelangten Karzinogenen zusammenwirken und zur Epithelschädigung führen (Weissburger *et al.*, 1987). Zur Tumorentstehung käme es dann, wenn im Darmepithel außerdem toxische oder hereditäre Veränderungen auf genetischer Ebene akkumulierten. Die im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz entscheidenden genetischen Ereignisse, die Aktivierung von Onkogenen (Ras) und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (DCC, p53), wurden von Vogelstein und Fearon in einem Mehrschrittmmodell beschrieben. Nach diesem Modell ist die Anhäufung von mindestens fünf bis sieben molekularen Veränderungen entscheidend.

Das initiale Ereignis beim Übergang des normalen Darmepithels in ein hyperproliferatives Epithel ist die Mutation des APC-Gens. Diese Mutation kann bei ca. 80 % der sporadischen CRC beobachtet werden und führt zu defekter Zelladhäsion sowie Destabili-

sierung des Zytoskeletts (Kinzler *et al.*, 1996). Auf zellulärer Ebene interagiert Wildtyp-APC unter anderem mit E-Cadherin und β -Catenin, transmembranösen Adhäsionsproteinen (Ozawa *et al.*, 1989). Dabei vermindert Wildtyp-APC die Expression von β -Catenin. In CRC wird β -Catenin hochreguliert und unterliegt vermutlich nicht mehr der Regulation durch mutiertes APC. Da die Überexpression von APC in APC-defizienten Kolonzelllinien Apoptose induzieren kann, ist β -Catenin möglicherweise antiapoptotisch wirksam (Morin *et al.*, 1996). Die Interaktion von APC mit β -Catenin scheint somit für die Tumor supprimierende Funktion von APC von Bedeutung zu sein. Zudem führt die Aktivierung des APC/ β -Catenin-Signalwegs durch verminderte Degradation von β -Catenin zur transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen wie z.B. c-Myc und Cyclin D1 (Morin *et al.*, 1999). Die Aktivität von β -Catenin ist für die Progression von CRC relevant und führt über verschiedene Mechanismen zur Deregulation des Signalwegs. Auch der Wnt/wg-Signalweg ist von β -Catenin abhängig. Durch APC-Inaktivierung wird dieser aktiviert und führt zur Stabilisierung von β -Catenin sowie Aktivierung von Zielgenen. Die Deregulation dieses Signalwegs ist ein wichtiges Ereignis bei der Genese verschiedener Malignome, wie z.B. dem CRC, dem hepatozellulären Karzinom (Miyoshi *et al.*, 1998) und dem malignen Melanom (Robbins *et al.*, 1996).

Ein weiteres Ereignis der malignen Transformation ist der Verlust von Methylgruppen (Hypomethylierung), welcher durch Hemmung der Chromosomenkondensation zu chromosomaler Instabilität führt und den Übergang in ein frühes Adenom fördert (Fearon und Vogelstein, 1990).

Im weiteren Verlauf führen Mutationen des Ras-Onkogens zu weiterer Zellproliferation und Adhäsionsverlust APC-mutierter Zellen. Der Ras-Signalweg ist an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt. Ras-Proteine binden mit hoher Affinität Guaninnukleoside und besitzen eine GTPase-Aktivität. Darüber vermitteln sie verschiedene extrazelluläre Signalwege wie Wachstumsfaktorstimulation, T-Zell-Aktivierung, Apoptose und Differenzierungsvorgänge (Lowry *et al.*, 1993). Die verschiedenen Ras-Gene, H-Ras, K-Ras und N-Ras sind in malignen Tumoren mutiert. Kolon- und Pankreaskarzinome aktivieren bevorzugt K-Ras aktiviert (Bos *et al.*, 1989).

Funktionsverluste der Tumorsuppressorgene DCC und p53 sind ein weiterer Schritt im Übergang von benignem zu malignem Wachstum. Mutationen des DCC-Gens, bei 70 % der CRC nachweisbar, führen zu weiterem Adhäsionsverlust der Zellen (Vogelstein *et al.*, 1988). Das vom p53-Gen kodierte, auch „Wächter des Genoms“ bezeichnete Protein, ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der zellulären Antwort auf zytotoxischen

Stress. P53 aktiviert oder reprimiert durch Sequenz spezifische Bindung an die Promotorregion die Expression verschiedener Gene der Zellzyklus- und Zelltodkontrolle. Die Mutation des p53-Gens führt dabei zu mangelhafter Induktion des programmierten Zelltods sowie Inaktivierung von Zellzyklusarrest und DNA-Reparaturmechanismen.

1.1.2 Genese des hereditären Adenokarzinoms

Etwa 15 % aller CRC sind hereditär bedingt, entweder durch eine genetische Prädisposition für familiäre Krebs syndrome, wie die familiäre adenomatöse Poliposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypösen kolorektale Krebs syndrom (HNPCC-Syndrom) oder als familiäre Häufung von kolorektalen Adenomen und Karzinomen (Houlston *et al.*, 1992).

Die FAP liegt 0,5 % aller kolorektalen Karzinome zugrunde. Im Gegensatz zu somatischen Mutationen beim sporadischen CRC, liegt eine Keimzellmutation des APC-Gens auf Chromosom 5q21 vor (Kinzler *et al.*, 1991). Die Träger des defekten Gens entwickeln schon im Jugendalter zahlreiche Polypen im Kolon und Rektum mit einem deutlich erhöhten Risiko zur malignen Entartung um das 30.- 45. Lebensjahr. Dabei lassen sich zusätzlich extrakolische Adenome des Dünndarms, Magens und der Schilddrüse nachweisen.

Das HNPCC-Syndrom, auch Lynch-Syndrom genannt, bedingt etwa 3 – 5 % aller CRC. Der Erkrankung liegen angeborene oder durch somatische Mutation erworbene Defekte im DNA-Mismatch-Repair-System zugrunde, die zu genetischer Instabilität führen und mit einem hohen Risiko für maligne Entartung unter karzinogenen Einflüssen einhergehen. Bekannt sind Mutationen der Mismatch-Repair-Gene MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 und MSH6/GTBP mit einem autosomal-dominant vererbten Erkrankungsrisiko von bis zu 90 %. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in frühzeitigem Auftreten von multiplen Adenokarzinomen im proximalen Kolon sowie extrakolischen Organen, wie z.B. Endometrium, Magen, Dünndarm und in den ableitenden Harnwegen. Für die Diagnosestellung des HNPCC ist die ausführliche Erhebung der Familienanamnese unter Anwendung der Amsterdam- und Bethesda-Kriterien entscheidend. Im Gegensatz dazu tritt das familiäre CRC gehäuft in Familien von ashkenasischen Juden auf und ist mit der Mutation II307K des APC-Gens assoziiert (Laken *et al.*, 1997).

1.2 Klinik und Diagnostik des CRC

Da kolorektale Karzinome häufig langsam wachsen, treten klinische Symptome meist erst spät durch Tumorprogredienz in Erscheinung. Die Leitsymptome sind deshalb unspezifisch. Befindlichkeitsstörungen, wie ein reduzierter Allgemeinzustand, Müdigkeit, Schwäche und Atemnot als Folge von Anämie, werden beobachtet. Intermittierende abdominelle, oft kolikartige Schmerzen sowie Änderung der Stuhlgewohnheiten, insbesondere Wechsel von Obstipation und Diarrhoe treten bei distalen Tumoren auf. Bei großen oder ulzerierend wachsenden Karzinomen führt häufig der positive Test auf okkultes Blut im Stuhl oder die makroskopische rektale Blutung zur Diagnose. Bei fortgeschrittenen Karzinomen kann gelegentlich der Tumor bei der abdominalen Palpation als Resistenz getastet werden. In ca. 15 % der Fälle führen Tumorobstruktion oder -perforation zur Verdachtsdiagnose. Bei metastasierten Tumoren steht die durch Metastasen bedingte Symptomatik, wie Leberinsuffizienz, Gerinnungsstörung, portale Hypertension und Proteinsynthesestörungen, im Vordergrund. Aufgrund der unspezifischen Frühsymptome sind Screeninguntersuchungen wie die rektal-digitale Untersuchung, der Test auf okkultes Blut im Stuhl und die Kolo- und Sigmoidoskopie von großer Bedeutung.

Die standardisierte Diagnostik bei klinisch begründetem Tumorverdacht umfasst eine apparative Diagnostik sowie laborchemische Untersuchungen. Die diagnostische Methode der Wahl ist die totale Koloskopie mit Gewebebiopsie zur Tumordeskription, Lokalisation und histologischen Diagnosesicherung. Alternativ ist auch eine Kapselendoskopie oder die weniger sensitive radiologische Darstellung des Dickdarms im Doppelkontrast möglich. Die Untersuchungen zum Tumorstaging umfassen weiterhin eine Bildgebung von Thorax und Abdomen zum Ausschluss von Fernmetastasen. Des Weiteren bieten die Endosonographie, Zystoskopie und gynäkologische Untersuchung Möglichkeiten der Beurteilung des infiltrativen Wachstums beim Rektumkarzinom (Schmoll *et al.*, 1997).

Für die Diagnose des HNPCC-Syndroms ist die Erhebung einer ausführlichen Familienanamnese von entscheidender Bedeutung. Diese wird derzeit mit Hilfe der Amsterdam- bzw. den erweiterten Bethesda-Kriterien wie in **Tabelle 2** und **3** dargestellt, bewertet. Mit Hilfe der seit 1998 etablierten Bethesda-Kriterien, gehen nun auch weitere Risikogruppen, wie z.B. Patienten ohne Familienanamnese oder Mehrfachtumoren so

wie morphologische Tumorcharakteristika in die Klassifikation ein. Des Weiteren wurden Marker zur Standardisierung der molekularen Diagnose der Mikrosatelliteninstabilität von HNPCC-Syndromen etabliert. Diese sind BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 und D17S250 (Boland *et al.*, 1997).

Tabelle 2: Amsterdam-Kriterien (nach CAO, AIO, ARO, 1999)

-
1. Mindestens drei Familienmitglieder mit kolorektalem Karzinom und/ oder Endometrium-, Dünndarm- oder urotheliale Karzinom von Nierenbecken oder Ureter
 2. Mindestens zwei aufeinander folgende Generationen betroffen
 3. Ein Familienmitglied erstgradig verwandt mit den beiden anderen
 4. Ein Erkrankter zum Zeitpunkt der Diagnose jünger als 50 Jahre
 5. Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP)
-

Anmerkung: Punkt 1-5 müssen erfüllt sein.

Tabelle 3: Bethesda-Kriterien (nach CAO, AIO, ARO, 1999)

-
- Patienten mit Krebserkrankungen in der Familie, die die Amsterdamkriterien erfüllen.
 - Patienten mit zwei HNPCC-assoziierten Karzinomen, einschließlich synchroner und metachroner kolorektaler Karzinome oder assoziierter extrakolonischer Karzinome ^a
 - Patienten mit kolorektalem Karzinom und einem erstgradigen Verwandten mit kolorektalem oder assoziiertem extrakolonischen Karzinom und/ oder einem kolorektalen Adenom; eine der Krebserkrankungen wurde im Alter < 45 Jahren diagnostiziert, das Adenom < 40 Jahren.
 - Patienten mit kolorektalem Karzinom oder Endometriumkarzinom, diagnostiziert im Alter < 45 Jahren.
 - Patienten mit rechtsseitigem Kolonkarzinom mit einem undifferenzierten (solid/ kribri-formen) Zelltyp in der Histopathologie, diagnostiziert im Alter < 45 Jahren ^b
 - Patienten mit kolorektalem Karzinom vom Siegelringzell-Typ, diagnostiziert im Alter < 45 Jahren ^c
 - Patienten mit Adenomen, diagnostiziert < 40 Jahren.
-

Anmerkung: einer der Punkte muss erfüllt sein. ^a Endometrium-, Ovarial-, Magen-, Dünndarm- oder hepatobiliäres Karzinom oder Übergangsepithelkarzinom des Nierenbeckens oder des Ureters; ^b Solid/ kribri-form – definiert als schwach differenziertes oder undifferenziertes Karzinom bestehend aus irregulären, soliden Haufen großer eosinophiler Zellen, die keine drüsenartigen Bestandteile aufweisen; ^c Bestehend aus > 50% Siegelringzellen.

1.3 Stadieneinteilung

Die Stadien des kolorektalen Karzinoms werden nach der Tumor-Nodus-Metastase (TNM)-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) eingeteilt, wobei für die signifikante pathologische Stadieneinteilung mindestens 15 Lymphknoten entnommen und histologisch untersucht werden sollten (**Tab. 4 und 5**). Im Gegensatz zur ersten von Dukes *et al.* 1932 etablierten Klassifikation kolorektaler Karzinome, die aus

schließlich den Darmwandbefall sowie die Lymphknoteninfiltration bewertet, werden in der TNM-Klassifikation die Infiltrationstiefe des Tumors, der Befall der regionalen Lymphknoten sowie die Manifestation von Fernmetastasen mitberücksichtigt (**Tab. 4**).

Tabelle 4: TNM- und Dukes-Klassifikation kolorektaler Karzinome

UICC-Stadium	T	N	M	Dukes-Stadium
0	T _{is}	N ₀	M ₀	
I	T ₁₋₂	N ₀	M ₀	A
II	T ₃₋₄	N ₀	M ₀	B
III	jedes T	N ₁₋₃	M ₀	C
IV	jedes T	N ₁₋₃	M ₁	

Anmerkung: UICC Union Internationale Contre le Cancer. T Infiltrationstiefe, N regionale Lymphknoten, M Fernmetastasen. Dukes-Klassifikation von 1932 (Cohen *et al*, 1997).

Tabelle 5: TNM-Stadieneinteilung des CRC nach UICC 1977

Primärtumor (T-Stadium)	
T _x	Primärtumor nicht beurteilbar
T ₀	kein Anhalt für Primärtumor
T _{is}	Carcinoma in situ
T ₁	Tumor infiltriert Submukosa
T ₂	Tumor infiltriert Muscularis propria
T ₃	Tumor infiltriert durch die Muskularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder peripankreatisches Gewebe
T ₄	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/ oder perforiert das viszerale Peritoneum
Regionäre Lymphknoten (N-Stadium)	
N _x	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N ₀	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N ₁	Metastasen in 1-6 regionären Lymphknoten
N ₂	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N ₃	Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten
Fernmetastasen (M-Stadium)	
M _x	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M ₀	Keine Fernmetastasen
M ₁	Fernmetastasen

Anmerkung: Nach UICC/TNM 1997: N₁ Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten; N₂ Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten.

1.4 Prognose

Der Verlauf von malignen Erkrankungen wird multifaktoriell durch prognostische Faktoren beeinflusst. Prognostische Faktoren sind Variablen, die selbstständig und unabhängig von anderen Faktoren Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen können (Hermanek *et al.*, 1997). Die anatomische Ausbreitung des Tumors ist der wichtigste gesicherte unabhängige tumorassoziierte Prognosefaktor für das CRC. Das nach der pTNM-Klassifikation festgelegte Tumorstadium, ausgehend von einer R₀-Resektion des Primärtumors, ist dabei entscheidend für die Prognose des jeweiligen Karzinoms. Die Prognose verschlechtert sich mit zunehmendem Tumorstadium. In **Tabelle 6** sind die 5-Jahresüberlebensraten verschiedener Studien dargestellt.

Tabelle 6: 5-Jahresüberlebensraten des CRC

Studie	Stadium	Kolonkarzinom	Rektumkarzinom	CRC
Miller <i>et al.</i> , 1992	I+II	92,5%	85,0%	
	III	61,0%	51,0%	
	IV	6,0%	5,5%	
Hermanek <i>et al.</i> , 1995	III			42,8%
Merkel <i>et al.</i> , 2001	III			49,1%

Weitere unabhängige gesicherte tumorassoziierte Prognosefaktoren nach erfolgreicher R₀-Resektion des Primärtumors sind außerdem der histologische Differenzierungsgrad und Einbrüche in das venöse Gefäßsystem. Des Weiteren konnte ein wesentlicher Einfluss des Chirurgen auf die postoperative Mortalität und Letalität sowie die 5-Jahresüberlebensrate beim CRC nachgewiesen werden (Hermanek *et al.*, 2000).

Als Grundlage für die stadienadaptierte Behandlung des CRC wird die TNM-Klassifikation den Therapiezielen jedoch nicht immer gerecht, da die einzelnen Tumorstadien inhomogene Gruppen darstellen. So konnten Greene *et al.* signifikante Unterschiede der 5-Jahresüberlebensrate von 5988 Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium III beschreiben (Greene *et al.*, 2003). Die subgruppenspezifische Untergliederung des Stadium III erfolgte in ein Stadium IIIa (T_{1/2}, N₁), b (T_{3/4}, N₁) und c (jedes T, N₂) und wies signifikant unterschiedliche 5-Jahresüberlebensraten postoperativ mit und ohne adjuvante Radiochemotherapie auf.

Neben einer Vielzahl von wahrscheinlichen Prognosefaktoren wie der Tumorlokalisation im Rektum, Tumorperforation und Obstruktion, Lymphgefäßinfiltration, männlichem Ge

schlecht, erhöhtem CEA-Spiegel und der Operationstechnik, scheint die Akkumulation von molekulargenetischen Ereignissen von Bedeutung zu sein. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl molekulargenetischer Marker ermittelt, deren prognostische Relevanz noch nicht eindeutig belegt werden konnte. So scheinen Onkogene, Tumorsuppressorgene, Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose, Zellproliferation und Angiogenese prognostisch bedeutsam zu sein. Von besonderem Interesse ist, dass diese molekulargenetischen Marker zur genaueren Untergliederung von Tumorstadien beitragen könnten. Arbeiten zur prognostischen Bedeutung von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren für verschiedene Tumorentitäten zeigen hierbei signifikante Unterschiede der 5-Jahresüberlebensrate in definierten Patientenkollektiven auf. Außerdem scheinen verschiedene Mechanismen der Chemotherapieresistenz von der Störung von Apoptose- und Zellzyklussignalwegen abhängig zu sein. Der genetische Status könnte somit in Zukunft zur Identifikation von Resistenzmechanismen beitragen, welche die posttherapeutische Prognose erheblich beeinträchtigen können.

1.5 Therapie des CRC im Stadium III und IV

Bei der Behandlung des CRC stehen neben der primär chirurgischen Therapie mit kurativer Zielsetzung die adjuvanten Therapiestrategien im Stadium III bzw. die verschiedenen palliativen Maßnahmen im Stadium IV im Mittelpunkt. Das Ziel der adjuvanten Therapie ist die Verbesserung der Prognose durch Elimination von disseminierten residualen Tumorzellen, welche Tumorrezidive bedingen können. Mit Hilfe der verschiedenen palliativen Verfahren soll eine Linderung der Krankheitsbeschwerden bei nicht heilbaren Tumoren erreicht werden.

1.5.1 Adjuvante Therapie

1.5.1.1 Kolonkarzinom

Der Regeleingriff zur chirurgischen Behandlung des Kolonkarzinoms ist die Hemikolektomie mit Resektion der proximalen Lymphknotenstationen entlang der Mesenterialgefäße. In Abhängigkeit von der Tumorlokalisation wird entweder eine Hemikolektomie rechts bei Tumoren des Zökums und Colon ascendens, eine Hemikolektomie links bei

Tumoren des Colon descendens oder eine Sigmaresektion durchgeführt. Bei Tumoren des Colon transversum wird abhängig von der Lokalisation eine Transversumresektion unter Mitnahme der Flexuren oder eine erweiterte Hemikolektomie durchgeführt. Neben der Tumorresektion in „no touch-Technik“ mit ausreichendem Sicherheitsabstand der Tumorränder nach oral und aboral werden außerdem die den Tumor versorgenden sowie die benachbarten Gefäßbündel zentral ausgeschaltet.

Die Voraussetzung für eine adjuvante Therapie im Stadium III ist die R₀-Resektion. Verschiedene adjuvante Therapiestrategien sind derzeit etabliert oder werden innerhalb von prospektiven Studien evaluiert. Nach der interdisziplinären Leitlinie, die durch die Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO), die Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Onkologie (CAO) und die Arbeitsgemeinschaft für Radiologische Onkologie (ARO) 1999 erarbeitet wurde, gilt ein Tumor im Stadium T₁₋₄ N₁₋₂ M₀ als gesicherte Indikation für eine adjuvante Therapie (Arbeitsgemeinschaft CAO/AIO/ARO der Deutschen Krebsgesellschaft, 1999). In den letzten 15 Jahren sind die Protokolle zur Therapie des Kolonkarzinoms vielfach überarbeitet worden. Außerhalb von klinischen Studien wird heute die Kombination von 5-Fluoruracil (5-FU) und Folinsäure (FA) über sechs bis acht Monate als adjuvante Therapie empfohlen (Arbeitsgemeinschaft CAO/AIO/ARO der Deutschen Krebsgesellschaft, 1999). Diese Schemata erwiesen sich der einjährigen Behandlung mit 5-Fluoruracil und Levamisol nach Moertel *et al.* als gleichwertig (Moertel *et al.*, 1995). Die adjuvante Therapie des Kolonkarzinoms kann im Rahmen von Studien durch die Gabe von Oxaliplatin zur Standardtherapie mit 5-FU und Leukovorin verbessert werden (Andre *et al.*, 2004).

1.5.1.2 Rektumkarzinom

Rektumkarzinome, kolorektale Karzinome, deren distales Ende 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt ist, grenzen sich durch die Lage im kleinen Becken, der Nähe zu nervalen Strukturen sowie dem Kontinenzorgan von Kolonkarzinomen ab. Tumore, die die Submukosa nicht überschreiten, gut differenziert sind und keine Lymphgefäßinvasion aufweisen, können lokal exzidiert werden. Bei weiter fortgeschrittenen Tumoren ist in Abhängigkeit der Lokalisation zum Kontinenzorgan entweder die abdominoperineale Exstirpation oder die tiefe anteriore Rektumresektion in kurativer Zielsetzung indiziert. Das Auftreten eines lokoregionären Rezidivs, welches aufgrund der Tumorcharakteristika

rakteristika häufiger auftritt als beim Kolonkarzinom, ist vom Tumorstadium und der Tumorböhe abhängig. Durch adjuvante Therapiestrategien sowie Strahlentherapie kann das lokoregionäre Rezidivrisiko gesenkt und die Prognose verbessert werden.

Die Indikation für eine adjuvante Therapie besteht für Patienten im Stadium III für Tumoren jeder Infiltrationstiefe (T_{1-4}), lokalem Lymphknotenbefall (pN_{1-2}) ohne Fernmetastasierung (M_0) nach den Empfehlungen der CAO, AIO und ARO von 1998. Außerdem sollte eine kombinierte Radiochemotherapie nach erfolgreicher R_0 -Resektion des Tumors durchgeführt werden. Eine adjuvante postoperative Bestrahlung in Kombination mit einer Chemotherapie führt zur Senkung des lokalen Rezidivs. Der Stellenwert der präoperativen Bestrahlung wird derzeit in Studien geprüft. Außerhalb von Studien wird für Tumoren im Stadium III des mittleren und unteren Drittels die postoperative Radiochemotherapie mit 5-FU und 45-54 Gy empfohlen. Tumore des oberen Rektumdrittels werden nach den Empfehlungen der AIO, CAO und ARO von 1998 wie Kolonkarzinome behandelt.

1.5.2 Palliative Therapie

Zur palliativen Behandlung des CRC stehen chirurgische, endoskopische, strahlentherapeutische, chemotherapeutische, medikamentöse und interventionell radiologische Maßnahmen zur Verfügung. Die Therapie sollte individuell geplant sowie in Abhängigkeit der vorliegenden Situation durchgeführt werden. Indikation einer palliativen Therapie ist eine nachgewiesene Tumorprogression, tumorbedingte Symptome sowie ein guter Allgemeinzustand (Karnovsky-Index $> 60\%$ bzw. WHO Grad 0-2). Vor der Einleitung einer palliativen Chemotherapie sollte in jedem Fall die Inoperabilität geprüft werden, da in einigen Fällen durch vollständige operative Entfernung von Metastasen eine Heilung erzielt werden kann. Des Weiteren sollte die Operabilität zur Entfernung eines resektablen Primärtumors mit dem Ziel der Wiederherstellung der Darmpassage geprüft werden. Bei nicht resektablem Tumor ist das Vorgehen symptomorientiert. Ein wesentlicher Bestandteil aller Therapiestrategien ist die adäquate Schmerztherapie.

Für die primäre Therapie diffuser, nicht resektabler Metastasen existieren verschiedene Protokolle, die auf modulierten 5-FU Bolus- sowie Dauerinfusionsprogrammen basieren. Auch die orale Therapie mit Capecitabin ist möglich. Durch Irinotecan- oder Oxaliplatinhaltige Programme kann die Remissionsrate erhöht und die Prognose verbessert wer

den (Tournigand *et al.*, 2004). Die verschiedenen Protokolle sind in **Tabelle 7** dargestellt. Nach systemischer Gabe einer Chemotherapie, im Sinne einer neoadjuvanten Therapie, kann die Resektabilität von Metastasen verbessert werden. Die Operabilität der Patienten sollte deshalb nach erfolgreicher systemischer Chemotherapie erneut geprüft werden.

Tabelle 7: Palliative Therapieschemata für das Kolonkarzinom

Protokoll	Zytostatika
Mayo	5-FU/ FA (425 mg/m ² ; 20 mg/m ² ; Tag 1-5; Wiederh. Tag 29; 6 Zyklen)
Machover	5-FU/ FA (200 mg/m ² ; 375 mg/m ² ; Tag 1-5; Wiedh. Tag 22-29)
AIO	5-FU/ FA (2600 mg/m ² ; 500 mg/m ² ; Wö. x 6; Wiederh. Tag 56)
orales Schema	Capecitabin (2500 mg/m ² ; Tag 1-14; Wiederh. Tag 22)
Kombinationsschemata	
Irinotecan mit AIO	5-FU/ FA/ Irinotecan (2600 mg/m ² ; 500 mg/m ² ; 80 mg/m ² ; wöchentlich)
Oxliplatin mit AIO	5-FU/ FA/ Oxaliplatin (2600 mg/m ² ; 500 mg/m ² ; 85 mg/m ² ; alle 2 Wochen)
FOLFIRI	5-FU/ LV/ Irinotecan (400 mg/m ² als Bolus + 2400-3000 mg/m ² über 46h alle 46 h alle 2 Wochen; 180 mg/m ² an Tag 1)
FOLFOX6	5-FU/ LV/ Oxaliplatin (400 mg/m ² als Bolus + 2400-3000 mg/m ² über 46h alle 46 h alle 2 Wochen; 100 mg/m ² an Tag 1)

Anmerkung: 5-FU 5-Fluoruracil; FA Folinsäure, LV Leukovorin; Wiederh Wiederholung; Wö wöchentlich; AIO Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie.

Bei isolierter Lebermetastasierung kann durch die direkte Gabe von 5-FU und Folinsäure in die A.hepatica eine höhere Remissionsrate erzielt und die Überlebenszeit verlängert werden (Lorenz *et al.*, 2001). Die Therapie wird jedoch von Komplikationen durch den Katheter, durch die Pumpen- oder Portsysteme sowie durch besondere Toxizitäten bei regionaler Applikation limitiert. Die neoadjuvante Chemotherapie nach dem FOLFOX-Schema konnte in einer Pilotstudie an 42 Patienten mit resektablen Lebermetastasen die Remissionsrate signifikant verbessern ohne die Morbidität zu erhöhen (Lorenz *et al.*, 2003).

1.6 Apoptose- und Zellzyklusregulation

Die Homöostase ausgereifter Gewebe wird durch das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Erneuerung reguliert. Die Genese maligner Tumore ist ein multifaktorieller Prozess als Folge von Veränderungen zellulärer Mechanismen, die zu Dysregulation von Zellproliferation und Zelltod führen. Eine Form des Zelltods ist der sogenannte „programmierte Zelltod“, Apoptose. Die Störung von Apoptosesignalwegen ist sowohl für die Entstehung als auch für die Therapie maligner Erkrankungen von zentraler Bedeutung. Auch die zelltodinduzierende Wirkung von zytotoxischen Chemotherapien und Bestrahlung wird vornehmlich über Apoptosesignalwege vermittelt.

1.6.1 Apoptosesignalwege

Der „programmierte Zelltod“, Apoptose, wird über eine komplexe Signalkaskade vermittelt. Durch die Aktivierung spezifischer Signale auf zellulärer Ebene werden sowohl zytoplasmatische als auch rezeptorvermittelte Signalwege induziert, die zur Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes (DISC; death-inducing signalling-complex) führen. Nachfolgend werden Apoptose fördernde Faktoren kaskadenartig aktiviert und verstärkt. Insbesondere kommt es hierbei zur Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen (Krammer *et al.*, 2000). Apoptose vermittelnde Enzyme lösen dann den programmierten Zelltod aus. DISC-Signalwege werden von verschiedenen Zellkompartimenten, u.a. von Mitochondrien (Kroemer und Reed, 2000), Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie (Krammer *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2001) und dem endoplasmatischen Retikulum vermittelt (Rudner *et al.*, 2002) (**Abb. 2**).

Apoptoseinduktion über den mitochondrialen DISC wird durch hemmende Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie (Bcl-2, Bcl-x_L) kontrolliert (Daniel *et al.* 2003a). Apoptose fördernde Mitglieder dieser Genfamilie, insbesondere Bax (Oltvai *et al.*, 1993), Bak und Bok, vermitteln eine direkte Aktivierung der Mitochondrien. Die durch Bax vermittelte Freisetzung von Cytochrom c und ATP aus dem intermembranösen Raum ins Zytoplasma (Jürgensmeier *et al.*, 1998) kann durch Bcl-2 gehemmt werden (Yang *et al.*, 1997). Der genaue regulatorische Mechanismus der Bcl-2-Genfamilie ist aber weiterhin unklar. Die Aktivierung am N-Terminus von Bax führt zur Translokation aus dem Zytoplasma in die

äußere Mitochondrienmembran sowie zur Oligomerisierung. Durch die Öffnung von Kanälen, die u.a. durch Bax, VDAC (voltage dependent anion channel)- und ANT (Adeninukleotidtransporter)-Protein gebildet werden, können Cytochrom c und dATP bei weiterhin aktiver Atmungskette ins Zytosol freigesetzt werden.

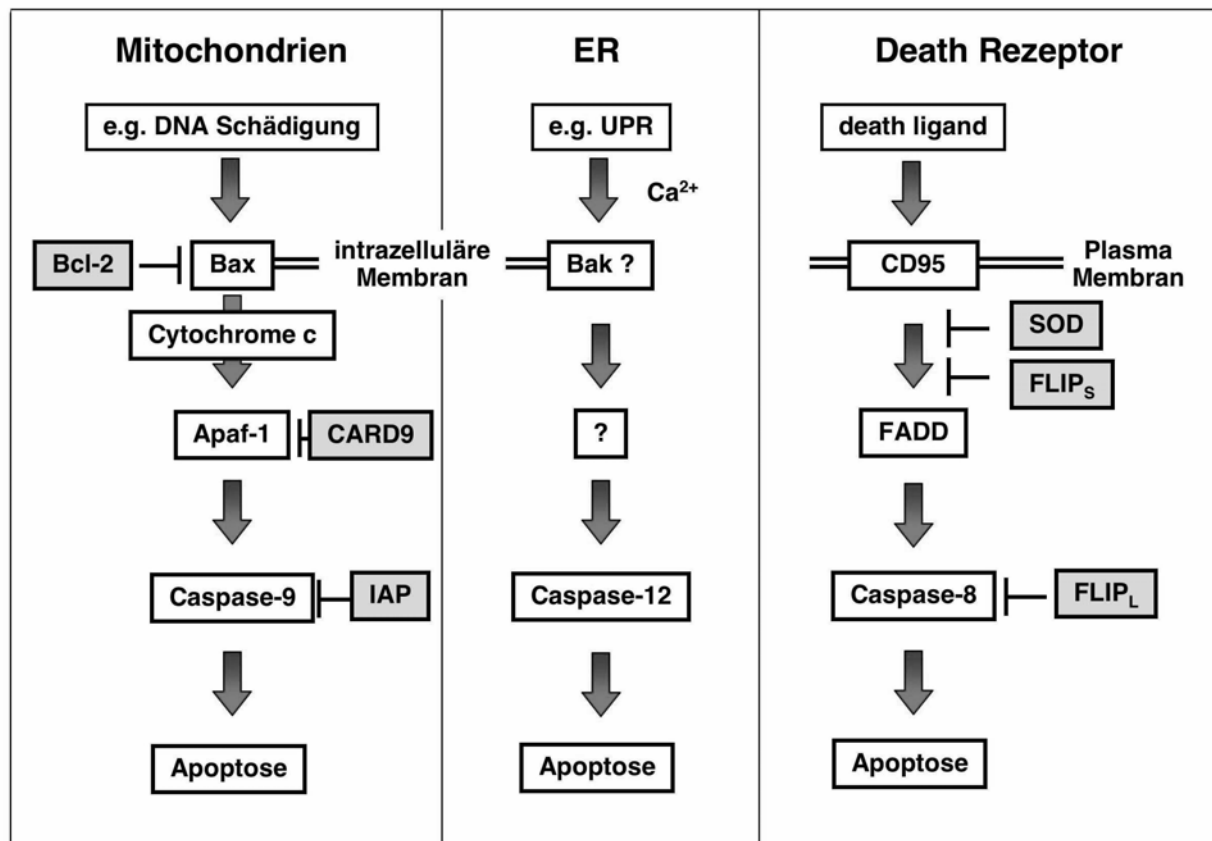


Abbildung 2: Apoptosesignalwege (Daniel, 2003a).

Anmerkung: Mitochondrien: Die Aktivierung von Bax führt zur Bildung eines Apoptose induzierenden Signalkomplexes (DISC death inducing signaling complex) und zur Aktivierung von Initiatorcaspasen, Caspase-9. ER (Endoplasmatisches Retikulum): Bak ist im ER lokalisiert und kann bei ER-Stress (UPR, unfolded protein response) Apoptose induzieren. Death Rezeptor (Todesrezeptor): Der durch den entsprechenden Liganden aktivierte Todes-Rezeptor (Death-Rezeptor) induziert einen zytosolischen DISC aus Adapterproteinen, z.B. FADD und Procaspase-8, die Apoptose auslösen. Die Signalwege können durch verschiedene Inhibitoren gehemmt werden: durch Bcl-2, CARD-9 Caspaserekrutierungsdomäne 9, SOD silencer of death domain, FLIP_s kurze Spleissvariante von Fas-linked inhibitory protein, FADD Fas-associated death domain, IAP inhibitor of apoptosis protein und FLIP_L lange Spleissvariante von Fas-linked inhibitory protein.

Ein alternatives Modell der Apoptoseinduktion durch Bcl-2-Homologe über den mitochondrialen Signalweg stellt die Akkumulation von Mitochondrien um den Zellkern mit nachfolgender Mitochondrienfragmentierung dar. Interessanterweise transloziert Bax zu Beginn der Apoptoseinduktion an bestimmte Foci des Mitochondriums, an welchen im Verlauf die Fragmentation stattfindet (Frank *et al.*, 2001). Der folgende Einstrom von

zytosolischen Ionen und H_2O führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der Permeabilitätstransition mit Platzen der äußeren und inneren Membran sowie zuletzt zur Inaktivierung der Atmungskette (Kroemer und Reed, 2000; Martinou und Green, 2001). Cytochrom c und dATP binden an APAF-1, das zentrale zytosolische Protein des mitochondrialen DISC, und führen zur Konformationsänderung und Aktivierung des Proteins (Li *et al.*, 1997). Über die nun exponierte CARD-Domäne (CARD Caspaserekrutierungsdomäne) wird die Bindung von Pro-Caspase 9 an die APAF-1-CARD-Domäne ermöglicht. Der aktive Proteinkomplex aus APAF-1, Cytochrom c, Pro-Caspase 9 und dATP, auch Apoptosom genannt, führt zur Spaltung von Pro-Caspase 9 zu biologisch aktiver Caspase 9. Durch limitierte Proteolyse werden nun die Effektorcaspasen -3, -6, und -7 aktiviert und die Endstrecke des Zelltods eingeleitet (Daniel *et al.*, 2000, 2001; Li *et al.*, 1997; Wieder *et al.*, 2001). Weitere proapoptotische Faktoren, die aus Mitochondrien freigesetzt werden sind: die Caspase-Aktivatoren Smac (second mitochondrial activator of apoptosis) und Omi/HtrA2, sowie Hsp10 (heat shock protein 10 kDa), AIF (apoptosis inducing factor), und Endonuklease G, deren Wirkmechanismen Gegenstand aktueller Diskussion sind (Daniel *et al.*, 2003b; van Loo *et al.*, 2002).

Ein weiterer Signalweg der Apoptoseaktivierung wird über Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie vermittelt. Diese sind in der Plasmamembran lokalisierte Transmembranrezeptoren, die durch eine Primärstruktur mit repetitiven cysteinreichen extrazellulären Domänen charakterisiert sind. Diese Domänen vermitteln die Trimerisierung der Rezeptoren und ermöglichen die Bindung der ebenfalls trimeren Liganden. Der intrazelluläre Teil dieser Rezeptoren enthält eine als Todesdomäne (DD Death-Domain) bezeichnete Aminosäuresequenz, welche die Bindung von signaltransduzierenden Adapterproteinen und die Bildung des DISC vermittelt (Daniel *et al.*, 2001). Derzeit sind sechs verschiedene Todesrezeptoren bekannt: 50 kDa TNF-Rezeptor (TNF-R1), CD95/Fas, TRAIL-Rezeptor DR3, TRAIL-Rezeptor 4, TRAIL-Rezeptor 5 und DR6. Bindung der entsprechenden Liganden an die DD führt durch Trimerisierung der Todesrezeptoren zu deren Konzentrationserhöhung am Wirkort sowie zur Rekrutierung der Adapterproteine FADD (FADD Fas associated death domain) im TNF-R1 und CD95/Fas-Signalweg bzw. RIP und RAIDD im TNF-R1-Signalweg. Über die gebundenen Adapterproteine werden Initiatorcaspasen zu aktiven Caspasen gespalten. Die dominante, durch TRAIL-Rezeptoren, CD95/Fas und TNF-1 Rezeptor vermittelt aktivierte Caspase, ist Caspase 8.

Auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) ist die DISC-Formation möglich. Apoptose wird durch eine ER-Stressantwort wie z.B. der UPR (UPR unfolded protein response) als Folge von Hemmung des Proteinexports aus dem ER (Rao *et al.*, 2001), Tunicamycin, Hypoxie oder Glukoseentzug mit Chaperonaktivierung induziert. Caspase-12, das zentrale Protein dieses Signalwegs bei der Maus, wird durch ER-Stresssignale wie z.B. Störung der Calciumhomöostase im ER oder Akkumulation missgefalteter Proteine aktiviert. Da die meisten Menschen aufgrund einer Keimbahnmutation keine Caspase-12 exprimieren, wird bei ihnen die Funktion wahrscheinlich durch Caspase-2 und -8 übernommen. Der Signalweg kann, obwohl er von Todesrezeptoren und dem mitochondrialen DISC unabhängig ist, durch Bcl-2 gehemmt werden, da dieses Protein auch in der äußeren ER-Membran lokalisiert ist.

Die bisher bekannten DISC-Signalwege sind untereinander funktionell vernetzt. Zentrale Proteine sind Bax und dessen Homologe Bak und Bok/Mtd, die durch eine Vielzahl von verschiedenen Signalen aktiviert werden. Eine vernetzende Funktion wird von BH3-only-Proteinen, wie z.B. Bad, Bim, BMF, Bid, Puma, Noxa und Hrk vermittelt. Diese Proteine enthalten nur eine der Bcl-2-Homologie-Domänen und können über Phosphorylierung deren Proteinfunktion regulieren. Noxa (Oda *et al.*, 2000), Puma (Nakano und Wousden, 2001), Hrk (Inohara *et al.*, 1997) und Nbk (Gillissen *et al.*, 2003) sind wahrscheinlich an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt. Bid (Wang *et al.*, 1996) ist ein Bindeglied zwischen Todesrezeptor vermittelter Apoptose und dem mitochondrialen DISC. Durch Caspase-8 unabhängige Spaltung zu tBid (tBid trunkiertes Bid) (Luo *et al.*, 1998) kann Bid mit Bax interagieren und es so aktivieren. Des Weiteren kann Bid nach Spaltung durch Caspase-3 über einen positiven Rückkopplungsmechanismus den mitochondrialen Signalweg aktivieren (Crompton *et al.*, 2000). BH3-only-Proteine wirken proapoptotisch durch Auslösen einer Konformationsänderung von Bax und dessen Homologen sowie Aktivierung des mitochondrialen DISC in Folge der Freisetzung von Cytochrom c.

Die Endstrecke des apoptotischen Zelltods wird über die aktivierten Effektorcaspasen-3, -6 und -7 vermittelt, welche weitere Proteasensysteme aktivieren. Proteasen wie Calpaine und Cathepsine degradieren regulatorische und strukturelle Proteine, wodurch das Zytoskelett, die Kernmembran und andere lebenswichtige Strukturen der Zelle zerstört werden. Diese Zerstörung der Zellorganellen führt zur Kondensation des nukleären Chromatins, zur Bildung von Mikronuklei, Ausstülpungen und Abschnürungen von

Membranteilen, auch Blebbing oder Zeiose genannt. Durch Erschöpfung des ATP-Gehalts bricht der zelluläre Energiestoffwechsel zusammen mit der Folge der Vakuolisierung der Zellorganellen. Letztendlich geht die Zelle zugrunde und wird von Gewebemakrophagen eliminiert. Die Erkennung apoptotischer Zellen wird hierbei durch die Exposition von Erkennungsstrukturen wie z.B. Phosphatidylseringruppen auf der Oberfläche der sterbenden Zelle sowie durch Lipidbotenstoffe vermittelt (Lauber *et al.*, 2003).

1.6.2 Zellzyklusregulation

Bei der Entstehung und Progression maligner Tumore ist neben der Apoptose die Dysregulation des Zellzyklus von zentraler Bedeutung. Zellwachstum entsteht durch die Progression der Zelle durch den Zellzyklus (Gillett und Barnes, 1998), welcher aus vier definierten Phasen besteht: G₁-, S-, G₂-, und M-Phase.

Der Übergang von ruhenden Zellen aus der G₀ in die G₁-Phase und von der G₁ in die S-Phase wird von G₁-Restriktionspunkten kontrolliert, welche die Zellzyklusprogression der frühen und späten G₁-Phase regulieren. Werden diese durch physiologische Stimuli aufgehoben, ist der Übergang in die S-Phase möglich, in welcher die DNA-Synthese stattfindet. Nach Beendigung der S-Phase geht die Zelle in die G₂-Phase über, in der die Segregation der replizierten DNA vorbereitet wird. Ist die Kondensation der Chromosomen abgeschlossen, geht die Zelle in die Mitose-Phase über und teilt sich in zwei Tochterzellen, die sich nun wieder in der G₁-Phase befinden. Die Zellzyklusprogression wird durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen (CDK; cyclin dependent kinases) reguliert, welche über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus steuern (Li und Blow, 2001). In jeder Zellzyklusphase werden spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen CDK interagieren und sie aktivieren. Diese zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus von Schlüsselsignalen aktivierten Regelsysteme nennt man Restriktionspunkte. Werden diese nicht aktiviert, wird die weitere Progression durch Aktivierung von Signalwegen, die zu Zellzyklusarrest und Reparatur oder Apoptose führen, verhindert. Die Dysregulation von Restriktionspunkten des Zellzyklus ist ein häufiges Ereignis in malignen Tumoren mit der Folge von genetischer und chromosomaler Instabilität.

In der frühen G₁-Phase führt eine Wachstumsstimulation zur verstärkten Transkription von D-Typ Cyclinen (Cyclin D1, D2, D3) und Cyclin E (Johnson und Walker, 1999), wel

che die entsprechenden Kinasen CDK 2, 4 und 6 aktivieren (**Abb. 3**). In der späten G₁-Phase wird CDK2 von Cyclin E aktiviert. In der S-Phase interagieren Cyclin A und CDK2, in der späten S-Phase sowie am S-G₂-Übergang Cyclin A und CDC2 (CDK1) und in der G₂-Phase sowie am G₂-M-Übergang Cyclin B/CDC2 (CDK1). Wachstums-hemmende Signale stimulieren die Transkription von Inhibitoren der CDK und aktivieren so den G₁-Restriktionspunkt.

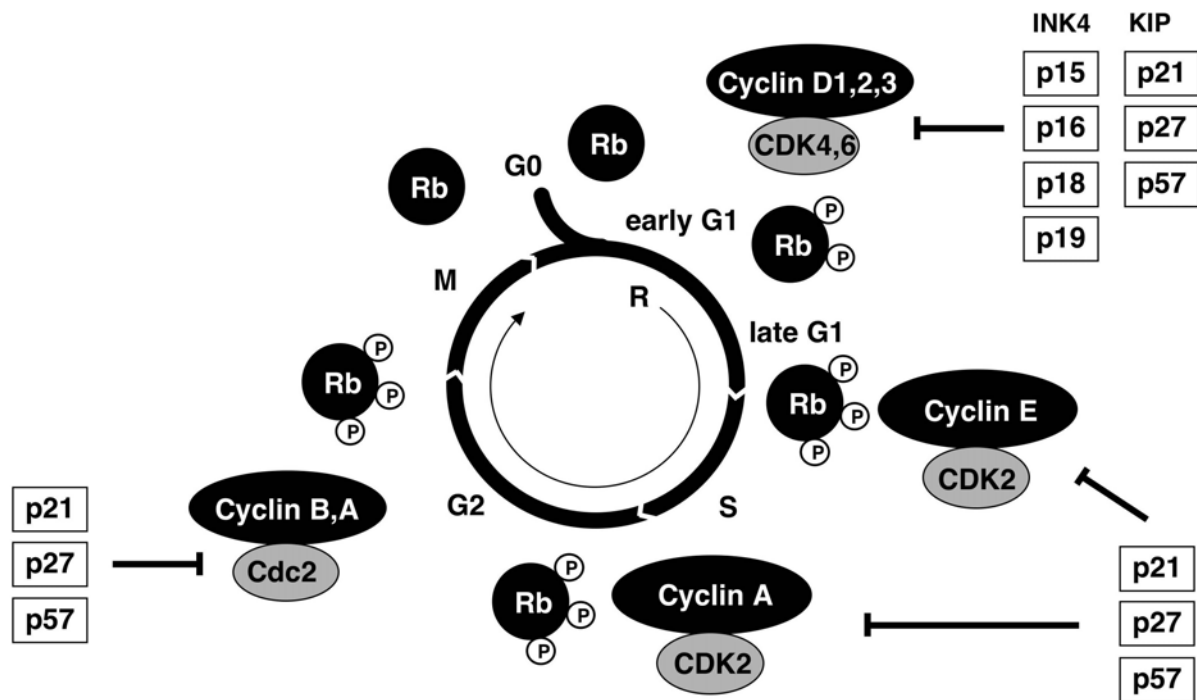


Abbildung 3: Zellzyklusregulation durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen (CDK) (Daniel, 2003a)

Anmerkung: Phasenabhängig exprimierte Cycline aktivieren spezifische CDK. Diese CDK phosphorylieren Rb und ermöglichen so die weitere Progression durch den Zellzyklus. CDKI (CDK Inhibitoren) können Cyclin-CDK-Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Die CDKI der INK4a-Familie hemmen G₁-Phase-Cycline, die der KIP-Familie können auch S- und G₂-Phase Cyclin-CDK-Komplexe hemmen.

Neben den genannten Restriktionspunkten wird die Zellzyklusprogression zusätzlich durch weitere Checkpunkte kontrolliert. DNA-Schädigung durch Zytostatika oder ionisierende Strahlung können so in jeder Phase Zellzyklusarrest auslösen, um den entstandenen Defekt zu beheben. Checkpunktkontrolle wird unter anderem durch Mitglieder der Retinoblastom (Rb)-Genfamilie, pRb, p107 und p130 vermittelt. Die Inaktivierung beider Rb-Allele, vorwiegend durch Keimbahnmutationen, ist mit der Entstehung von Retinoblastomen assoziiert. Eine Inaktivierung in Folge von somatischen Mutationen

oder Deletionen des Genlokus wird bei einer Vielzahl von Tumoren im erwachsenen Alter beobachtet. Durch reversible Bindung von Transkriptionsfaktoren wird die Kontrollfunktion am G₁-S-Übergang durch pRb vermittelt. Dabei phosphorylieren Cyclin-CDK-Komplexe das Rb-Protein und vermitteln so die Progression in die S-Phase. Rb bindet im hypophosphorylierten Zustand reversibel an Transkriptionsfaktoren der E2F/Dp-Familie und hemmt dadurch die Promotoraktivierung Zellzyklus regulierender Gene. Die weitere Zellzyklusprogression kann nur durch Phosphorylierung, also funktioneller Inaktivierung von pRb erfolgen. Mehrfache Phosphorylierung von Rb in der G₁-Phase führt zu dessen Inaktivierung und gleichzeitiger E2F-Aktivierung. E2F bindet nun an Mitglieder der Dp-Familie und bildet dadurch biologisch aktive Transkriptionsfaktoren mit Transkription von Genen, wie z.B. Histonen, PCNA, Difolatreduktase und Ribonukleotidreduktase und löst so den Übergang in die S-Phase aus. Die Rolle von Rb ist in späteren Zyklusphasen weniger gut definiert (Grana *et al.*, 1998). In der S- und G₂-Phase wird pRb durch den Cyclin A-CDK-CDC2-Komplex sowie den Cyclin B-CDK-CDC2-Komplex im hyperphosphorylierten Zustand gehalten. Gegen Ende der M-Phase wird Rb durch verminderte Cyclin B-Expression dephosphoryliert. Die Zelle befindet sich bis zur erneuten Phosphorylierung in der G₁-Phase.

Die Aktivität der Cyclin-CDK-Komplexe wird durch Inhibitoren (CDKI; cyclin dependent kinase inhibitors) vermittelt, die den Zellzyklus in jeder Phase anhalten können. Die CDKI der INK4-Familie (*inhibiert* CDK4) hemmen spezifisch die Cyclin-CDK-Komplexe der G₁-Phase, wohingegen Mitglieder der CIP/KIP-Familie die Cyclin-CDK-Komplexe der S- und G₂-Phase hemmen. Zur INK4-Familie gehören p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d} (Roussel *et al.*, 1999), welche spezifisch die Cyclin D-abhängigen CDK4 und CDK6 hemmen. Dadurch verhindern sie die Phosphorylierung von Rb und somit die Progression aus der G₁- in die S-Phase. Die CIP/KIP-CDKI-Proteine p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} hemmen bevorzugt die Aktivität von CDK2-Komplexen. Eine Hemmung von CDK4-Komplexen kann auch *in vitro* beobachtet werden.

1.6.3 Zellzyklus und Apoptose

Das Überleben von Zellen wird durch Vernetzung der Signalwege von Zellzyklus und Apoptose koordiniert (Evan und Vousden, 2001). So kann die Überexpression von Zellzyklus stimulierenden Faktoren wie E2F-1 (Adams und Kaelin, 1996) oder c-Myc (Evan *et al.*, 1992) Apoptose auslösen. Bei gleichzeitiger Expression antiapoptotischer Signale wie z.B. Bcl-2 überlebt die Zelle den Proliferationsstimulus und schreitet im Zellzyklus fort (Cory *et al.*, 1999). Gleichmaßen kann die Aktivierung von Apoptosesignalen durch Zellzyklusarrest gehemmt werden. p21^{Waf1/Cip1} kann so antiapoptotisch wirken (Waldmann *et al.*, 1996). Andererseits kann lang anhaltender Zellzyklusarrest auch Apoptosesignalwege aktivieren. Durch diese Mechanismen wird in normalen Zellen dereguliertes Wachstum verhindert.

DNA-Schädigung oder die Deregulation des G₁-Restriktionspunktes durch E2F, Ras oder c-Myc führen zur Induktion der INK4a-Proteine p14^{INK4d} und p16^{INK4a}. Über eine Hemmung der Cyclin D-CDK4/6-Komplexe führt p16^{INK4a} zum G₁-Zellzyklusarrest. Das gleichzeitig induzierte p14^{ARF} kann in mehreren Schritten Apoptose induzieren. p14^{ARF} ist das 2. Genprodukt des INK4a-Genlokus und wird durch Verwendung eines eigenen Promotors und eines alternativen Exons 1 translatiert und gespleisst. Das Leseraster ist deshalb bei der Proteintranslation verschoben und es entsteht ein Protein mit völlig anderer Aminosäuresequenz und Funktion als p16^{INK4a} (Serrano *et al.*, 2000). p14^{ARF} bindet und destabilisiert das Mdm-2-Protein (murine double minute-2-Protein) und fördert so dessen Abbau über das Proteasom. Wie in **Abbildung 4** dargestellt, reguliert Mdm-2 über einen negativen Feedbackmechanismus den p53-Proteinspiegel. P53 wiederum ist ein transkriptioneller Aktivator des Mdm-2-Gens. Die p53-Expression ist deshalb unter normalen Bedingungen niedrig. Fällt die Mdm-2 vermittelte Hemmung weg, wird p53 stabilisiert und die p53-Proteinexpression erhöht. E2F und c-Myc können so über einen p14^{ARF}/Mdm-2/p53-vermittelten Signalweg Apoptose induzieren. p53 kann nun über Aktivierung Zellzyklus hemmender Gene wie p21^{Waf1/Cip1} zum Zellzyklusarrest führen. Allerdings kann p14^{ARF} auch unabhängig von p53 oder p21^{Waf1/Cip1} Apoptose vermitteln. Des Weiteren ist es in der Lage, unabhängig von p53 oder Bax den mitochondrialen DISC zu aktivieren (Hemmati *et al.*, 2002). Weitere Regulatoren der zellzyklusspezifischen Apoptose sind das antiapoptotische Survivin, ein Mitglied der IAP (inhibitor of apoptosis protein)-Familie und das proapoptotische BH3-only-Protein Bim.

Auch p53, das zu den häufigsten inaktivierten Genen in malignen Tumoren zählt, hat durch seine transkriptionelle und posttranslationale Aktivität Einfluss auf die Zellzyklusregulation. Als Transkriptionsfaktor Apoptose fördernder Gene (p21^{Waf1/Cip1}, Bax, APAF-1, Puma, Noxa, PIG, IGF-BP3, Gadd45, 14-3-3 σ , u.a.) sowie transkriptioneller Repressor von Überlebensgenen (Bcl-2, Bcl-x_L) kann p53 den programmierten Zelltod induzieren. Durch den p53-vermittelten Zellzyklusarrest und die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen nach Bestrahlung oder Zytostatikabehandlung kann sich die Zelle von genotoxischen Schäden erholen und überleben (Funk *et al.*, 1999). Versagen die Reparaturmechanismen, werden von p53 vermittelte Zelltodsignale aktiviert, und die Zelle geht zugrunde.

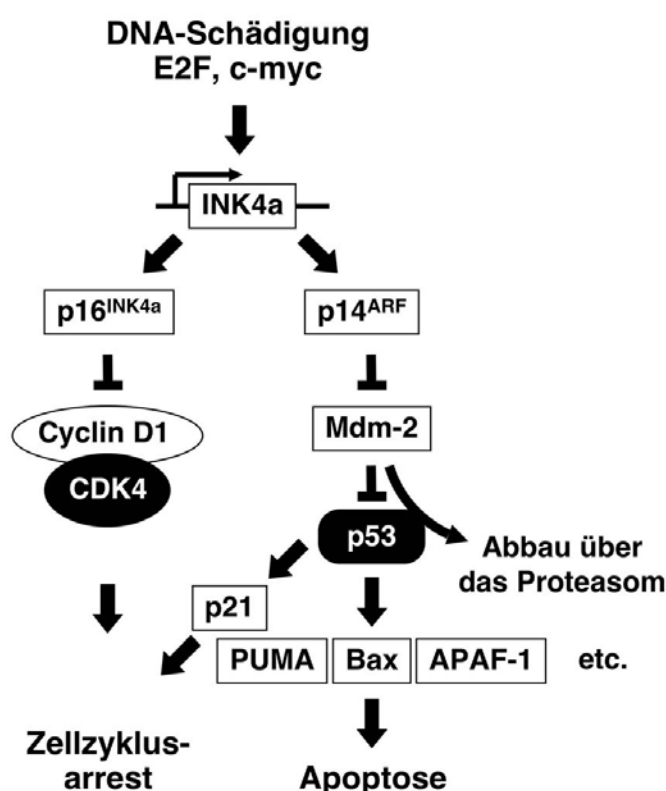


Abbildung 4: Vernetzung von Zellzyklus- und Apoptoseregulation, p14^{ARF}/p53-Signalweg (Daniel, 2003a).

Anmerkung: DNA-Schädigung oder Deregulation von Zellzyklus regulierenden Genen führt zur Aktivierung und Expression von p16^{INK4a} und p14^{ARF}. p16^{INK4a} vermittelt über Hemmung von CDK4-Cyclin D1-Komplexen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. p14^{ARF} destabilisiert Mdm-2, einen Inhibitor von p53, und fördert dessen Abbau über das Proteasom. Dadurch kann p53 stabilisiert werden und als transkriptioneller Aktivator von zellzyklushemmenden (z.B. p21^{Waf1/Cip1}) und apoptosefördernden Genen (z.B. Bax, Puma, APAF-1) wirken.

Für andere Zellzyklusphasen existieren ebenfalls apoptosekontrollierende Checkpunk

te. Der G₂-Restriktionspunkt wird durch ATM-, ATR- und DNA-PK-Proteinkinasen kontrolliert. Durch DNA-Schädigung kann so entweder Zellzyklusarrest ausgelöst oder über einen p53-abhängigen Signalweg Apoptose induziert werden (Taylor und Stark 2001). Ein in allen Zyklusphasen regulierender Mechanismus stellt der CDKI p21^{Waf1/Cip1} dar. p21^{Waf1/Cip1} kann in der G₁-, S und G₂-Phase den Zellzyklus anhalten, um Reparaturvorgänge geschädigter Zellen zu ermöglichen.

1.6.4 Inaktivierung von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren in Tumoren

Durch die Akkumulation von Defekten in Apoptosesignalwegen und der Zellzyklusregulation wird die Gewebekomöostase gestört und malignes Wachstum gefördert.

Einer der ersten Apoptose- und Zellzyklusregulatoren, der mit Krankheitspathogenese und Therapieresistenz in Verbindung gebracht werden konnte, ist das p53-Tumorsuppressorgen (Taylor und Stark, 2001). P53 kann durch Mutation, bevorzugt in den Exonen 5 bis 8 der DNA-Bindungsdomäne bzw. durch Deletion (Chromosom 17p) inaktiviert werden. Inaktivierung von p53 durch Missense-Mutationen kann bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet werden (Hollstein *et al.*, 1994). Die Relevanz der p53-Mutationen für die klinische Prognose des CRC ist jedoch nicht eindeutig bewiesen. Einige Analysen konnten eine prognostische Relevanz nachweisen (Borreson-Dale *et al.*, 1998; Goh *et al.*, 1995), andere wiederum nicht (Elsaleh *et al.*, 2000; Paradiso *et al.*, 1996). Ursächlich dafür könnten Defekte in den abhängigen Signalwegen sein, z.B. der Verlust der Bax-Expression. Auch eine Überexpression von Mdm-2 kann bei verschiedenen Tumoren beobachtet werden. Bei ALL im Kindesalter geht Mdm-2-Überexpression mit einer schlechten Prognose einher. Die pathogenetische Veränderung der p53-abhängigen Signalwege von p14^{ARF} und p16^{INK4a} konnten ebenfalls prognostische Relevanz aufzeigen. So geht verminderte Expression p14^{ARF} bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie mit schlechter Prognose einher (Müller-Tidow *et al.*, 2004). Der Verlust von p16^{INK4a} ist bei Patienten mit malignem Melanom (Reed *et al.*, 1995), Adenokarzinom des Pankreas (Hu *et al.*, 1997), Bronchialkarzinom (Kratzke *et al.*, 1996) oder Ösophaguskarzinom (Huang *et al.*, 2000) von prognostischer Relevanz. Auch die Dysregulation des mitochondrialen Signalwegs, insbesondere von Mitgliedern der Bcl-2-Familie, ist für eine Vielzahl maligner Tumore und hämatologischer Neoplasien von pathogenetischer und prognostischer Relevanz. Die Überexpression von Bcl-2

in follikulären Lymphomen sowie bei B-CLL, teils durch die Translokation t (14;18) vermittelt, geht mit einer schlechteren klinischen Prognose einher. Der Verlust des proapoptotischen Bax-Proteins ist ein häufiges Ereignis bei malignen Tumoren und mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert (Sturm *et al.*, 1999, 2000, 2001; Prokop 2000). Wahrscheinlich liegt ein Defekt auf transkriptioneller Ebene im Bax-Promotor vor, der einen hohen Gehalt an CpG-Inseln enthält. Bax-Mutationen stellen eher selten die Ursache des Expressionsverlustes dar und werden häufiger bei gastrointestinalen Tumoren mit Mismatch-Repairdefekten beobachtet. Die pathogenetische und klinische Relevanz der Bax-Mutationen in Tumoren mit Mismatch-Repair-Defekten ist noch unklar. Die Deregulation von APAF-1, ein Mitglied des mitochondrialen DISC, ist ein häufiges Ereignis bei malignen Melanomen und geht mit verminderter Chemosensitivität der Zellen einher (Soengas *et al.*, 2001).

Die Inaktivierung von Todesrezeptoren ist ein eher seltenes Ereignis (Rozenfeld-Granot *et al.*, 2001). Mutationen des CD95/Fas-Rezeptors können aber gehäuft bei Patienten mit Burkitt-Lymphom oder Canale-Smith-Syndrom beobachtet werden.

Störungen von hemmenden Zellzyklusregulatoren stellen ein weiteres sehr häufiges Ereignis bei der malignen Transformation dar. Eine veränderte Aktivität der CDK-Inhibitoren, z.B. p16^{INK4a}, kann bei einer Vielzahl maligner Tumoren beobachtet werden. Ursachen der Inaktivierung können verminderte Expression durch Promotormethylierung, Deletion, Mutation der CDK oder CDKI oder Störung von Regulatoren der CDKI-Expression sein. Der Verlust von p16^{INK4a} oder p21^{Waf1/Cip1} ist häufig mit einer schlechten Prognose verbunden. Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit Rektumkarzinom, welche neoadjuvant radiochemotherapiert worden waren, eine erhöhte p21^{Waf1/Cip1}-Expression vier bis sechs Wochen nach Abschluss der Radiochemotherapie mit einem schlechteren tumorfreien Überleben zu beobachten (Rau *et al.*, 2003). Induktion von p21^{Waf1/Cip1} könnte damit einen bislang unbekannten, durch die Radiochemotherapie vermittelten Resistenzmechanismus darstellen.

1.6.4.1 p53 reguliert Apoptose- und Zellzyklussignalwege

Das p53-Protein wurde 1979 von verschiedenen Arbeitsgruppen in virologischen und serologischen Studien identifiziert. In intensiven Studien zum SV40-Virus konnte die Expression eines zellulären 54-kDa Protein nach Stimulation von Mauszellen durch In

fektion und Transfektion beobachtet werden (Chang *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). 1982 konnten Crawford *et al.* erstmals Antikörper gegen das humane p53-Protein in Sera von 9 % der Patientinnen mit Mammakarzinom nachweisen, welche eine onkogene Funktion des Protein vermuten ließ. In den späten 80er Jahren wurde die Funktion des p53-Proteins als Tumorsuppressor beschrieben. In Zellen eingeschleuste p53-Wildtyp-Gene hemmten das Zellwachstum und die Inaktivierung von p53 im Mausmodell, welche mit einer erhöhten Rate von Tumoren verbunden ist. In evolutionär konservierten Domänen des Proteins können p53-Mutationen häufig nachgewiesen werden. Screeninguntersuchungen von DNA kolorektaler Tumore konnten p53-Mutationen als ein häufiges Ereignis beschreiben (Fearon und Vogelstein, 1990), welches nachfolgend auch bei einer Vielzahl weiterer Tumorentitäten identifiziert werden konnte. Ob diese Mutationen von prognostischer Relevanz sind, ist noch unklar. Bei Patienten mit dem seltenen Li-Fraumeni-Syndrom liegt eine Keimbahnmutation des p53-Gens vor.

Das p53-Gen, auf Chromosom 17p lokalisiert, kodiert einen Transkriptionsfaktor, der sowohl zellzyklusregulierende als auch apoptoseinduzierende Eigenschaften besitzt. Das humane p53-Protein enthält 393 Aminosäuren, die sich strukturell und funktionell in verschiedene Domänen unterteilen lassen. Die ersten 42 Aminosäuren bilden den N-Terminus mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne. Die Core-Domäne liegt zwischen den Aminosäuren 102 und 292 und enthält eine sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne. Der C-Terminus ist an der Tetramerisierung des Proteins beteiligt. P53 kann sowohl Gene, die p53-Bindungsstellen besitzen, transkriptionell aktivieren oder, in Folge der Interferenz mit anderen Transkriptionsfaktoren hemmen.

Missense-Mutationen des p53-Gen treten überwiegend in der Core-Domäne, bevorzugt in den Exonen 5 bis 8 der DNA-Bindungsdomäne auf (Hollstein *et al.*, 1994). Diese Mutationen gehen mit erhöhtem Entartungsrisiko einher. Auch am N-Terminus in der Transaktivierungsdomäne können Mutationen beobachtet werden, welche die Interaktionen mit TAF (TAF TATA box-binding protein associated factor) und Mdm-2 stören. p53 kann auch durch Deletionen inaktiviert werden.

Der basale p53-Wildtyp Spiegel ist gewebeabhängig und aufgrund eines hohen Proteinumsatzes sowie der Repression durch Mdm-2 gering. Durch genotoxische Schäden wie DNA-Strangbrüche aufgrund ionisierender oder UV-Strahlung oder zytotoxischem Stress wie Hypoxie, Hitze, virale Infektion oder Onkogenaktivierung wird p53 induziert und stabilisiert. Durch verminderten, Mdm-2-vermittelten Abbau wird die Halbwertszeit

des Proteins verlängert und so die basal niedrige Proteinexpression posttranslational auf ein höheres Niveau reguliert. Über die Transaktivierung von Zielgenen vermittelt p53 seine verschiedenen Funktionen: die Regulation von Wachstum, Zellzyklus und Apoptose. Zielgene sind u.a. p21^{Waf1/Cip1}, Mdm-2, Gadd45, Bax und IGF-BP3. Wie in **Abbildung 3** dargestellt, wird Zellzyklusarrest über Induktion von p21^{Waf1/Cip1} als Antwort auf DNA-Schäden vermittelt. Zusätzliche Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen nach Bestrahlung oder Chemotherapie ermöglichen der Zelle, sich von der Schädigung zu erholen und zu überleben (Funk, 1999). P53-vermittelte Apoptose kann als Folge von DNA-Schäden, adenoviraler Expression von E1A oder c-Myc oder nach Entzug von Wachstumsfaktoren (IGF-BP3) aktiviert sowie durch antiapoptotisches Bcl-2 gehemmt werden. Weiterhin ist p53 ein transkriptioneller Aktivator von BH3-only-Proteinen wie Puma, Noxa, Hrk und Nbk, die über einen Bax- bzw. Bak-abhängigen Mechanismus Apoptose induzieren (Daniel *et al.*, 2003a). Über Aktivierung von Bax, dem mitochondrialen DISC und der Caspasenkaskade wird Apoptose ausgelöst. Die Inaktivierung des p53-Signalwegs sowie der vor- und nachgeschalteten Regulatoren ist nicht nur für die Entstehung von Tumoren sondern auch für die Entwicklung von Therapieresistenzbildung von zentraler Bedeutung.

1.6.4.2 Bax ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie

Bax, 1993 erstmals beschrieben (Oltvai *et al.*, 1993), ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie, welches an der p53-vermittelten Apoptoseinduktion beteiligt ist. Das Bax-Gen, auf Chromosom 19 lokalisiert, enthält 6 kodierende Exons für das 21,4 kDa Protein Bax (alpha). Das aus 192 Aminosäuren bestehende Protein weist eine hohe Homologie zum Bcl-2 Protein auf. Proteine der Bcl-2 Familie enthalten die homologen Domänen BH-1 bis BH-4 (BH: Bcl-2 Homologie-Domäne). Mit Hilfe der BH-3 Domäne kann Bax *in vivo* homodimerisieren oder mit Bcl-2 Heterodimere bilden und so Bcl-2 inaktivieren. Es wird angenommen, dass das intrazelluläre Bax/Bcl-2-Verhältnis die Aktivierung von Apoptosesignalwegen reguliert. Verstärkte Bax-Expression kann die Sensitivität von Mammarkarzinomzellen gegenüber Zytostatika erhöhen und Therapieresistenz überwinden (Bargou *et al.*, 1996; Radetzki *et al.*, 2002). Des Weiteren kann Bax, wie auch die anderen Bcl-2 Homologe oligomerisieren und Ionenkanäle bilden (Shimizu *et al.*, 2000). Intrazellulär ist Bax im Zytosol lokalisiert bzw. locker mit der äußeren Mito

chondrienmembran verbunden. In den meisten gesunden Geweben ist Bax als Monomer im Zytosol lokalisiert, wo es in der inaktiven Form vorliegt (Hsu und Yule, 1998). Während der Induktion des mitochondrialen Signalwegs wird Bax aktiviert und vollzieht eine C- und N-terminale Transformation, die zur Translokation ins Mitochondrium führt (Eskes *et al.*, 2000). Die Aktivierung von Bax resultiert in der Insertion von Bax in die äußere Mitochondrienmembran. Gleichzeitig oligomerisiert Bax zu multimeren Komplexen. Diese Bax-Oligomere besitzen Kanal bildende Eigenschaften, die mit Ionenfluss sowie konsekutivem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials assoziiert werden können. Es wird angenommen, dass die Kanalformation von Bax für die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium verantwortlich ist. Wird Bax durch Sequenz spezifische Bindung von p53 an den Bax-Promotor aktiviert (Miyashita und Reed, 1995), induziert es den mitochondrialen DISC wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben. Neben dem p53-vermittelten Signalweg, existiert auch p53-unabhängige Bax-Aktivierung. Verlust des Bax-Proteins kann bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet werden. In den meisten Tumoren geht der Verlust von Bax-Protein mit einer schlechteren Prognose oder einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie einher (Sturm *et al.*, 1999, 2000; Gascoyne *et al.*, 1997; Tai *et al.*, 1998; Friess *et al.*, 1998; Krajewski *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde ein Bax-Verlust nach Chemotherapie bei Kindern mit ALL beobachtet (Prokop *et al.*, 2000). Die Ursache für den Bax-Verlust ist in den meisten Tumoren noch unklar. Wahrscheinlich führt die Hypermethylierung von CpG-Inseln des Bax-Promotors zum Proteinverlust. Bei einem geringen Teil der Tumore können Mutationen im Bax-Gen nachgewiesen werden. Meist sind es Frameshiftmutationen eines G(8)-Mononukleotidtrakts (Basen 114-121), die zur Ausbildung eines Stopkodons mit Verlust der Bax-Proteinexpression führen. Diese Frameshift-Mutationen des Bax-Gens führen zur Translation eines trunkierten Proteins, welches jedoch mit N-terminalen immunhistochemischen Antikörper nicht detektiert werden kann. Dieser Mechanismus scheint jedoch ein seltenes Ereignis der Karzinogenese des CRC zu sein (Simms *et al.*, 1998). Bei bis zu 50 % aller kolorektalen Adenokarzinome mit Mikrosatelliteninstabilität, 5 - 15 % aller sporadischen CRC, konnten aber Bax-Frameshiftmutationen beschrieben werden (Rampino *et al.*, 1997). Andere Mutationen sind Punktmutationen der BH1- und BH3-Domäne, welche die Dimerisationsfunktion und proapoptotische Aktivität verändern (Meijerink *et al.*, 1998). Das Bax-Protein ist aufgrund seiner proapoptischen Eigenschaften von zentralem Interesse für das Verständnis von Apoptosesignalwegen und Therapien maligner Tumore.

1.6.4.3 p16^{INK4a} hemmt die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK 4/6

Das Tumorsuppressorgen p16^{INK4a} konnte 1993 erstmal auf Chromosom 9p21 lokalisiert werden. Es kodiert für ein 16 kDa Protein mit 156 Aminosäuren, das in humanen diploiden Fibroblasten nach Transfektion mit SV40-Virus mit Cyclin abhängigen Kinasen assoziiert (Xiong *et al.*, 1993). Aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6, wurde das Protein p16^{INK4a} „Inhibitor von CDK4“ genannt. Voraussetzung für die Zellzyklusprogression in der G₁-Phase ist die Assoziation von D-Typ-Cyclinen mit CDK4 und CDK6. INK4a-Proteine hemmen CDK 4 und 6 und kontrollieren so den Rb-Signalweg sowie den G₁-S-Übergang. Homologe des p16^{INK4a} sind p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d} (Roussel *et al.*, 1999). Die INK4a-Proteine wirken als kompetitive Inhibitoren durch direkte Bindung an CDK 4 und 6. Die zelluläre p16^{INK4a}-Expression ist in den meisten Geweben niedrig. Über die transkriptionelle Regulation von p16^{INK4a} ist bislang wenig bekannt. Es scheint ein Feedback-Mechanismus über pRb zu existieren, der die Transkription auf das drei- bis fünffache steigern kann. Eine E2F-Bindungsstelle des p16^{INK4a}-Promotors ist bislang jedoch unbekannt.

Aktiviert wird p16^{INK4a} über einen p53-abhängigen Signalweg bei zellulärem Stress wie DNA-Schäden oder deregulierter Aktivierung Zellzyklus fördernder Gene wie c-Myc oder E2F. p16^{INK4a} vermittelt über die Hemmung von CDK4/6-Cyclin-D-Komplexen G₁-Arrest.

Inaktivierung von CDKI, insbesondere des p16^{INK4a}-Gens, ist ein häufiges Ereignis in humanen Tumoren und kann als Folge verschiedener Prozesse entstehen. Auf genetischer Ebene sind homozygote sowie heterozygote Deletionen in Exon 1 oder 2 beschrieben worden, die zu Frameshift-Mutationen und Nonsense-Proteinen führen, sowie Deletionen des gesunden Gens. Auf epigenetischer Ebene sind Hypermethylierungen von CpG-Inseln der Promotorregion bekannt. In einigen Fällen von familiärer Prädisposition für das maligne Melanom oder Adenokarzinom des Pankreas, können auch Keimbahnmutationen detektiert werden (Hussussian *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1995). Die meisten dieser genetischen oder epigenetischen Veränderungen resultieren in einer verminderten oder fehlenden p16^{INK4a}-Proteinexpression (Reed *et al.*, 1995; Papdimitrakopoulou *et al.*, 1997). Zellen mit verminderter oder fehlender p16^{INK4a}-Expression sind resistent gegen DNA-Schäden, die bei Zellen mit intaktem p16^{INK4a} und Rb-Protein zum Wachstumsarrest führen (Shapiro *et al.*, 1998). Auch Mutationen der

CDK und Störungen von Regulatoren der CDKI-Expression können eine Inaktivierung bedingen. Die Bedeutung der Deregulation der CDKI für die Tumorbilogie ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Der Verlust von CDKI ist häufig mit einer schlechten Prognose und Progression der Tumorerkrankung assoziiert (Sturm *et al.*, 2001; Kratze *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1997; Heyman *et al.*, 1996; Fizotti *et al.*, 1995).

1.7 Fragestellung

Die prognostisch wichtigsten Faktoren für das CRC sind die Infiltrationstiefe und der Metastasierungsstatus des Primärtumors. Sie werden durch die TNM-Klassifikation beschrieben. Diese bietet Ärzten eine Methode zur Therapieplanung, Prognoseabschätzung und Bewertung des Krankheitsverlaufs. Als Grundlage für die stadienadaptierte Behandlung CRC wird die UICC/TNM-Klassifikation den Therapiezielen sowie der Prognoseabschätzung jedoch nicht immer gerecht. Bis heute basiert die Klassifikation ausschließlich auf der anatomischen Tumorausbreitung. In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl nicht-anatomischer, aber für die Prognose bedeutender Marker identifiziert werden. Neben klinisch-pathologischen Risikofaktoren, wurden molekulare Marker ermittelt, welche sich in Studien als prognostisch relevant erwiesen. Von großer Bedeutung sind hierbei Regulatoren von Apoptose- und Zellzyklus, da die Therapieprotokolle zur Behandlung von CRC vornehmlich apoptoseinduzierende Therapeutika einsetzen. Des Weiteren scheinen auch Therapieresistenzen über Störungen dieser Signalwege vermittelt zu werden.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die prognostische Relevanz des p53/Bax/p16^{INK4a}-Signalwegs für ein Kollektiv von 116 Patienten mit CRC im Stadium III und IV untersucht werden. Hierbei sollte der Expressions- und Mutationsstatus von p53, Bax und p16^{INK4a} analysiert und mit den Tumorcharakteristika TNM-Status, Differenzierungsgrad und Lokalisation sowie weiteren klinisch-pathologischen Daten im klinischen Verlauf korreliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Tumorgewebe

In die retrospektive Analyse wurden Patienten mit sporadischem kolorektalem Adenokarzinom im UICC Stadium III und IV nach operativer Therapie am Universitätsklinikum Benjamin-Franklin (Freie Universität zu Berlin) zwischen 1989 und 1991 aufgenommen (Grabowski *et al.*, 2000). Alle Patienten im Stadium III wurden einer radikalen Resektion des Primärtumors und regionaler Lymphadenektomie in kurativer Intention unterzogen. Drei Tumore konnten jedoch nur als R₁-Resektion exstirpiert werden. Alle Tumore wurden nach Diagnosestellung durch die UICC/TNM-Klassifikation bewertet, so dass das N-Stadium mit N₀ bis N₃ beziffert ist. Unvollständiges Follow-up (n=7) oder Staging (n=8), das Auftreten eines Zweitkarzinoms postoperativ innerhalb von 3 Jahren nach Diagnosestellung (n=8) oder Tod von Patienten postoperativ innerhalb von 30 Tagen (n=7), führten zum Ausschluss aus dem anfänglich aus 146 Patienten bestehenden Patientenkollektiv (Grabowski *et al.*, 2001). Das hier untersuchte Kollektiv besteht aus 116 Patienten. 59 Patienten befanden sich im Stadium III und 57 im Stadium IV nach den Kriterien der UICC. Für diese Patienten war eine Nachbeobachtung für einen Zeitraum von mindestens 5 Jahren oder bis zum Sterbedatum vorhanden, welche mit Hilfe eines Fragebogens an Hausärzte und das Einwohnermeldeamt vervollständigt und aus Klinik eigenen Daten der Nachsorgesprechstunde für Tumorpatienten der chirurgischen Poliklinik ergänzt wurde. Die mittlere Beobachtungszeit für das Gesamtkollektiv betrug 42,1 Monate \pm 3,9 SEM (SEM: Standardfehler), das mediane Überleben betrug 17 Monate. Die detaillierten klinisch-pathologischen Daten sind in **Tabelle 8** zusammengefasst.

Tabelle 8: Klinisch-pathologische Daten des Patientenkollektivs

		Stadium III	Stadium IV
Patienten	n	59	57
Geschlecht	männlich	24 (40,7 %)	31 (54,3 %)
	weiblich	35 (59,3 %)	26 (45,6 %)
Alter (Jahre)	Durchschnitt	63,4	66,1
	Range	26-87	42-87
Lokalisation	Kolon	31 (52,5 %)	42 (73,7 %)
	Rektum	23 (40,0 %)	9 (15,8 %)
	Rektosigmoid	5 (7,5 %)	6 (10,5 %)
TNM-Klassifikation	pT ₁	2 (3,3 %)	1 (1,8 %)
	pT ₂	6 (10,1 %)	2 (3,5 %)
	pT ₃	39 (66,1 %)	39 (68,4 %)
	pT ₄	12 (20,3 %)	15 (26,3 %)
	pN ₀	0 (0,0 %)	13 (22,8 %)
	pN ₁	41 (69,5 %)	26 (45,6 %)
	pN ₂	18 (30,5 %)	17 (29,8 %)
	pN ₃	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
Differenzierungsgrad	G ₁	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)
	G ₂	40 (67,8 %)	37 (64,9 %)
	G ₃	19 (32,2 %)	19 (33,3 %)
Präoperative Strahlentherapie	n	18 (30,5 %)	4 (7,0 %)
Adjuvante Chemotherapie	n	3 (5,1 %)	0 (0,0 %)
Palliative Chemotherapie	n	0 (0,0 %)	16 (28,1 %)

Anmerkung: T Infiltrationstiefe. N Lymphknotenstatus. M Fernmetastasen.

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht

In dieser Studie wurde der Expressions- und Mutationsstatus von p53, Bax und p16^{INK4a} in einer großen Patientengruppe mit CRC bestimmt und in Kenntnis der klinisch-pathologischen Daten ausgewertet. Für das Mutationsscreening wurde genomische DNA aus dem Tumorgewebe der Patienten isoliert, welche als Matritze für die durch Polymerasekettenreaktion (PCR) zu amplifizierende Bindungsdomäne des p53-Gens diente. Die amplifizierten Exone 5 - 8 wurden mittels Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-PCR auf Mutationen untersucht. Für die Expressionsanalyse des

Bax- und p16^{INK4a}-Proteins wurde das Tumorgewebe immunhistochemisch gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch von zwei Untersuchern ausgewertet. Die gewonnenen Daten wurden mit klinisch-pathologischen Daten korreliert und statistisch analysiert.

2.2.2 Präparation der genomischen DNA

Die genomische DNA wurde aus 30 µm dicken Gewebeschnitten von in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe extrahiert und bei –20 °C gelagert. Das folgende Protokoll wurde verwendet:

Deparaffinierung des Probenmaterials:

1. Gewebeschnitt in 1 ml n-Octan lösen, bei 14000 upm zentrifugieren und den Überstand verwerfen. Zur vollständigen Entparaffinierung Wiederholung des Reaktionsschritts.
2. Rehydrierung des Gewebepellets in 0,5 ml Ethanol (96 %) und kurze Zentrifugation bei 14000 upm.
3. Entfernen des Alkohols durch Abpipettieren und Inkubation bei 52 °C im offenen Reaktionsgefäß.

DNA-Extraktion wurde mit dem Invisorb®Spin Tissue Kit durchgeführt:

1. Lyse des Gewebepellets in 400 µl Lysepuffer und 40 µl Proteinase K für 12 h bei 52 °C unter kontinuierlichem Schütteln.
2. Zentrifugation für 2 min bei 14000 upm. Zur Einstellung von optimalen Bindungsbedingungen Überführung der im Überstand gelösten DNA in neues Reaktionsgefäß mit 200 µl Bindungspuffer.
3. Inkubation der DNA-Lösung auf einer Säule für 2 min bei Raumtemperatur. Zentrifugation bei 12000 upm für 2 min. Verwerfen des Filtrats und Waschen der Säule mit 550 µl Waschpuffer. Erneute Zentrifugation bei 12000 upm für 1 min.
4. Elution der DNA von der Säule durch Inkubation für 2 min bei 52 °C mit 50 µl Elutionspuffer (10 mM Tris HCl/ 0,1 mM EDTA Puffer, pH 8,7). Zentrifugation bei 10000 upm. Aliquotierung und Lagerung der DNA bei –20 °C.

2.2.3 Amplifikation der p53-Bindungsdomäne (Exon 5-8)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine der schnellsten *in vitro*-Techniken zur gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten für weiterführende molekulare Analysen. Mit Hilfe von Oligonukleotidprimern, kurzen einzelsträngigen DNA-Molekülen, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (Template) sind, synthetisiert die DNA-Polymerase in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) einen komplementären DNA-Strang entlang der Matrize. Mit Hilfe von DNA-Thermocyclern ist der schnelle Wechsel und die Einstellung unterschiedlicher Temperaturen möglich, die für die DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und Extension der komplementären DNA-Stränge notwendig sind.

Die PCR-Primer für die Mutationsanalyse der p53-Bindungsdomäne wurden aus dem Protokoll von Weyrer *et al.* für die Exone 5 - 8, die für die DNA-Bindungsdomäne des Proteins kodieren, übernommen (Weyrer *et al.*, 1996). Exon 5, welches aufgrund seiner Größe mit 2 Primerpaaren in 2 PCR-Produkte unterteilt wurde, Exon 6, Exon 7 und Exon 8 wurden amplifiziert. Die Primer sind in **Tabelle 9** aufgelistet und haben eine Länge von 18 bis 21 Basenpaaren (bp). Die amplifizierten PCR-Produkte waren 139 bis 199 bp lang und hatten somit eine optimale Länge für die SSCP-Analyse.

Tabelle 9: PCR-Primer für die p53-Mutationsanalyse

Exon	sense-Primer	antisense-Primer
5 a	5'-CCA GTT GCT TTA TCT GTT CA-3'	5'-TGT GGA ATC AAC CCA CAG-3
5 b	5'-CAA CTG GCC AAG ACC TGC-3'	5'-AAC CAG CCC TGT CGT CTC T-3'
6	5'-CTC TGA TTC CTC ACT GAT TGC-3'	5'-GAG ACC CCA GTT GCA AAC CA-3'
7	5'-TTG CCA CAG GTC TCC CCA A-3'	5'-AGG GTG GCA AGT GGC TCC-3'
8	5'-CCT TAC TGC CTC TTG CTT C-3'	3'-CGC TTC TTG TCC TGC TTG C-3'

Anmerkung: A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin.

Alle Arbeitsschritte der PCR der Bindungsdomäne des p53-Gens sind nach dem bereits etablierten Protokoll von Sturm *et al.* (Sturm *et al.*, 1999) für die Tumorproben-DNA optimiert worden. Für die Durchführung der PCR-Reaktion wurden 2 µl Aliquots der genomischen DNA eingesetzt und mit 48 µl Reaktionsgemisch in einem Gesamtvolumen von 50 µl zur Reaktion gebracht. Die Konzentrationen der Reagenzien wurde für die

Amplifikation der Proben optimiert und sind in **Tabelle 10** aufgelistet. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler nach dem Protokoll in **Tabelle 11** durchgeführt.

Tabelle 10: PCR-Reagenzien für p53-Mutationsanalyse

Reagenzien	Exon 5a, 6, 7, 8	Exon 5b
genomische DNA	2,0 µl	2,0 µl
PCR-Reaktionspuffer	5,0 µl	5,0 µl
dNTP (12,5 mM je dNTP)	0,4 µl	0,8 µl
sense-Primer (50 pM)	0,5 µl	1,0 µl
antisense-Primer (50 pM)	0,5 µl	1,0 µl
MgCl ₂ (1,5 mM)	3,0 µl	6,0 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl	0,4 µl
Aqua bidest	38,2 µl	38,2 µl

Anmerkung: dNTP Desoxynukleosidtriphosphate.

Tabelle 11: PCR-Protokoll für 35 Zyklen

Exon	Initiale De-naturierung	DNA-Denaturierung	Primeranlagerung	Extension	finale Extension
	94 °C	94 °C	AT	72 °C	72 °C
5 a	4 min	30 s	20 s/ 55 °C	15 s	7 min
5 b	4 min	30 s	20 s/ 65 °C	15 s	7 min
6	4 min	30 s	20 s/ 60 °C	15 s	7 min
7	4 min	30 s	20 s/ 58 °C	20 s	7 min
8	4 min	30 s	20 s/ 60 °C	15 s	7 min

Anmerkung: AT annealing temperature.

2.2.4 Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

Als Screeningverfahren zur Detektion von p53-Mutationen wurde in dieser Studie die Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-PCR ausgewählt. Die Methode hat sich in verschiedenen Studien als zuverlässiges und informatives Verfahren zur Identifizierung von Mutationen in durch PCR amplifizierten Regionen des Genoms erwiesen. Obwohl die Sensitivität dieser Methode nur bei 80 - 90 % liegt und somit einige Mutationen unerkannt bleiben, ist sie trotzdem aufgrund der Einfachheit und schnellen Durchführbarkeit ein anerkanntes Verfahren zum Screening großer Patientenkollektive (Condie *et al.*, 1993; Orita *et al.*, 1989). Ziel dieser Studie war es, p53-Mutationen in den Tumorproben aufzudecken, um deren prognostische Relevanz zu untersuchen. Durch Optimierung der Elektrophoresebedingungen vor Screeningbeginn und Herstellung von

PCR-Fragmenten, die eine Größe von 200 bp nicht überschritten, konnte die Sensitivität der Methode noch gesteigert werden (Hayashi *et al.*, 1993, Condie *et al.*, 1993). Durch diese Vorgehensweise konnte das Patientenkollektiv schnell und effizient auf p53-Mutationen untersucht werden.

Die Methode der SSCP-PCR basiert auf der elektrophoretischen Beweglichkeit von Molekülen innerhalb einer Gelmatrix, die von der Größe, Ladung und Form, welche durch die intramolekulare Basenpaarung, also der Sequenz, bestimmt wird. Der einzelne DNA-Strang ist unter nicht denaturierenden Bedingungen gefaltet. Bei der nicht denaturierenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese, können schon geringste Sequenzänderungen Einfluss auf die Konformation des Stranges und somit auch auf die Laufeigenschaften nehmen (Orita *et al.*, 1989). Der Unterschied einer einzigen Base genügt, damit sich zwei Stränge unterschiedlich falten (Newton und Graham, 1994).

Bei der SSCP-PCR werden die zu amplifizierenden DNA-Fragmente durch Hitze denaturiert und in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Durch schnelles Abkühlen falten sich die einzelnen DNA-Stränge zurück und nehmen eine sequenzspezifische Konformation ein. Im Vergleich mit Wildtyp-DNA faltet sich der mutierte DNA-Strang aufgrund der veränderten Basensequenz anders und hat dadurch andere Laufeigenschaften in der Elektrophorese. Auf dem mit Silbernitrat (AgNO_3) gefärbten Gel erkennt man die veränderten Laufeigenschaften als aberrierende Bande. Nukleinsäuren reagieren dabei mit AgNO_3 zu elementarem Silber, das als schwarze Bande sichtbar wird. Durch die Färbung können Nukleinsäuren im Picogrammbereich mit einer Sensitivität von 20-50 μg DNA pro Bande nachgewiesen werden. Die Proben mit aberrierenden Bandenmustern entsprechen Alterationen des p53-Gens.

Alle Arbeitsschritte der SSCP-Analyse wurden unter für die Tumorproben optimierten Bedingungen nach dem Protokoll von Sturm *et al.* (Sturm *et al.*, 1999) auf einem zehnprozentigen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel durchgeführt. Dafür wurde die Gellösung (**Tab. 12**) in eine vorbereitete Gelkammer aus zwei 26 x 20 cm Glasplatten gegossen. Nach 90 minütiger Polymerisation wurde das auf einer Folie fixierte Gel in eine Multiphor IITM-Elektrophoresekammer platziert und in TBE-Puffer getränkte Filterpapierstreifen aufgebracht. Um optimale Elektrophoresebedingungen zu schaffen, wurde der Vorlauf bei 100 V und 50 mA gestartet.

Präparation der Proben für die Elektrophorese:

1. Mischen von Proben und Ladungspuffer (1:1) und Denaturierung für 5 min bei 95 °C
2. Sofortiges Abkühlen auf Eis für 1 min zur Fixierung der einzelsträngigen DNA.
3. Auftragen von je 8 µl der denaturierten Probe, der Kontrolle für denaturierte DNA (4 µl denaturiertes PCR-Produkt LoVo-DNA, 4 µl SSCP-Ladungspuffer) sowie der Kontrolle für nicht denaturierte DNA (4 µl nicht-denaturiertes PCR-Produkt LoVo-DNA mit 4 µl SSCP-Ladungspuffer) in die Taschen des Gels.
4. Elektrophorese bei 50 mA, 300 V und 22 °C für 30 min und weitere 30 min bei 900 V.

Tabelle 12: nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (10 %)

Reagenzien	Volumen
Aqua bidest	11,0 ml
TBE-Puffer	20,0 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (29:1) 40%	5,0 ml
APS 10 %	125 µl
TEMED	25 µl

Anmerkung: APS Ammoniumpersulfat, TEMED N,N,N-Tetramethylethylendiamin

Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde eine Silberfärbung mit dem PlusOne™-DNA Silver Staining Kit durchgeführt:

1. Fixierung der Nukleinsäuren mit 25 ml Fixierlösung (Benzolsulfonsäure 3 %; Ethanol 24 %) im Gel für 30 min.
2. Anfärbung der Nukleinsäuren mit Färbelösung (Silbernitrat 1 %; Benzolsulfonsäure 0,35 %) für 30 min.
3. Spülen mit Aqua dest. für 1 min zur Entfernung der überschüssigen Reagenzien.
4. Entwicklung in Entwicklerlösung (Natriumcarbonat 12,5 %, Formaldehyd 37 % und Natriumthiosulfat 2 %) für 4 min.
5. Beendigung der Reaktion in Stopplösung (Essigsäure 5 %; Natriumacetat 25 %; Glycerin 50 %) für 30 min.

2.2.5 Immunhistochemische Färbung

Bei der Untersuchung von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren in verschiedenen Ge

weben hat sich das Verfahren der immunhistochemischen Färbung bewährt. Mit dem Verfahren steht eine geeignete Screeningmethode zur Verfügung, die sich in der Durchführung als Kosten- und Zeit-günstig sowie in der Aussagekraft als zuverlässig erwiesen hat. Zur Qualifizierung des Bax- und p16^{INK4a}-Status wurde deshalb in dieser Studie die Analyse der Proteinexpression mittels Immunhistochemie gewählt. Die immunhistochemische Färbetechnik mittels Peroxidase konjugiertem Streptavidin und dem Chromophor DAB ist ein etabliertes Verfahren. Dabei wird die Bindung des Primärantikörpers an das Antigen als intensive Braunfärbung erkannt, welche einen guten Kontrast zur HE (Hämatoxylin-Eosin)-Gegenfärbung darstellt. Obwohl die Aussagekraft der immunhistochemischen Analyse von verschiedenen Parametern abhängig ist - von Art und Dauer der Gewebefixation, von der Schichtdicke der Gewebeschnitte, der Spezifität und Sensitivität der Antikörper, der posttranslationalen Modifikation der Proteine sowie der subjektiven Beurteilung der Untersucher – stellt sie eine zuverlässige und effiziente Methode zur Genexpressionsanalyse dar.

Zur Detektion der Bax- und p16^{INK4a}-Proteinexpression wurde die immunhistochemische Färbung mit den monoklonalen Primärantikörpern YTH-2D2 für Bax und G175-405 für p16^{INK4a} durchgeführt. Der primäre, gegen das Zielantigen gerichtete Antikörper wird dabei von einem sekundären mit Biotin konjugierten Antikörper gebunden. Das Vitamin Biotin weist eine hohe Affinität zum Streptavidin-Protein auf, welches in diesem Fall an Peroxidase gekoppelt ist. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats (DAB) wird dieses durch die Peroxidase umgesetzt und es entsteht eine Farbreaktion. Die Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung wurden für die Primärantikörper optimiert und nach dem bereits etablierten Protokoll von Sturm *et al.* (Sturm *et al.*, 1999) durchgeführt:

1. Entparaffinierung in Xylol für 20 min der auf Objektträgern fixierten Gewebeschnitte (Schichtdicke 4 µm) sowie der internen Positiv- bzw. Negativkontrolle. Rehydrierung für je 2 min in absteigender Alkoholreihe (Ethanol 96 %, 80 %, 70 %, 50 % und Aqua bidest) und Überführung in TBS-Puffer.
2. Zur Antigendemaskierung Kochen der Gewebeschnitte in Zitratpuffer (pH 6,0) für 10 min. Waschen mit Aqua bidest für 5 min und Lagerung in TBS-Puffer. Abklopfen der Flüssigkeit und Abgrenzung des Gewebes mit hydrophobem PAP-Stift.
3. Blockierung der endogenen Peroxidase mit H₂O₂. (3 %).

4. Blockierung der unspezifischen Protein-Protein-Bindungen mit 200 µl Sea-Block® (100 %), einer kommerziell erhältlichen Fischserum-Lösung, je Schnitt und Inkubation für 10 min.
5. Dekantieren der Lösung und Übersichtung der Schnitte mit 200 µl des Primärantikörpers. Der monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes Bax-Protein, Klon YTH-2D2 (Trevigen, USA), in der Konzentration von 25 µg/µl, wurde zum Gebrauch auf 1:750 bzw. 0,003 µg/µl in TBS-Puffer verdünnt. Der monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes p16^{INK4a}-Protein, Klon G175-405 (Pharmingen, USA), in der Konzentration von 0,5 mg/ml, wurde zum Gebrauch auf 1:150 bzw. 0,003 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt.
6. Inkubation in feuchter Kammer für 1h bei Raumtemperatur.
7. Nach Waschen (3x) mit TBS-Puffer Auftragen von 200 µl des polyklonalen biotinylierten Sekundärantikörpers (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG und IgM (H+L), 1,6 mg/ml, Jackson ImmunoResearch, USA), auf 1:250 bzw. 0,006 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt.
8. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.
9. Waschen (3x) in TBS-Puffer Auftragen von Streptavidin-konjugierter Peroxidase (Peroxidase-conjugated-Streptavidin, 1,0 mg/ml, Jackson ImmunoResearch, USA), zum Gebrauch auf 1:500 bzw. 0,02 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt.
10. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.
11. Waschen (3x) in TBS-Puffer und Färben der Schnitte mit 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (1% in Stable Peroxide Solution Buffer). Inkubation für 5 - 10 min. Entfernen des überschüssigen Farbstoffs mit Aqua bidest und Gegenfärben mit Hämatoxylin nach Mayer für ca. 15 min. Bläuen in Leitungswasser. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe zum Eindecken in Paraclear®, einem Eindeckmedium und Deckgläsern.

2.2.6 Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Durch immunhistochemische Färbung ist es möglich, die Expression der Proteine Bax und p16^{INK4a} nachzuweisen. Bei positiver Proteinexpression wird eine Färbung des Zytoplasmas (Bax) oder eine Färbung der Zellkerne (p16^{INK4a}) sichtbar. Als interne Kontrolle wurde für beide Antikörper Tumor- und Normalgewebe verwendet, die zur

Überprüfung der Antikörperfunktion dienen. Als probeninterne Positivkontrolle der Färbung diene die Anfärbung von infiltrierenden lymphatischen Zellen. Die mikroskopische Auswertung der Immunfärbung wurde quantitativ durchgeführt. Zwei Untersucher beurteilten die gefärbten Schnitte hinsichtlich der Färbequalität und Intensität ohne Kenntnis der klinisch-pathologischen Daten. Für die Auswertung wurden jeweils 4 Gesichtsfelder in 400-facher Vergrößerung untersucht und der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen (0 - 100 %) in jeweils 5%-Schritten und die Färbeintensität (0 - +++ bzw. 0 - 3) beurteilt. Eine Färbeintensität von 0 entspricht einer negativen Proteinexpression von Bax oder p16^{INK4a}, Grad 1 bedeutet niedrige Expression und Grad 2 und 3 entsprechen mäßiger bzw. hoher Expression. Für alle weiteren statistischen Analysen wurde der Färbeindex angewendet, welcher sich aus dem Produkt der positiv gefärbten Zellen und der Färbeintensität errechnet und so eine Spannbreite (Range) von 0 - 300 aufweist. Die Tumormproben zeigen in der immunhistochemischen Analyse des Bax-Proteins eine überwiegend zytoplasmatische und in einigen Fällen auch nukleäre Proteinexpression. In Übereinstimmung mit anderen Autoren und vorangegangenen Analysen (Sturm *et al.*, 1999) wurde nur die zytoplasmatische Färbung ausgewertet. Die Expression von p16^{INK4a} war größtenteils nukleär und zytoplasmatisch. In Anlehnung an Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten (Ruas und Peters, 1998) wurde nur die nukleäre Proteinexpression ausgewertet. Zur Qualitätssicherung wurden zufällig ausgewählte Proben von einem Pathologen beurteilt.

2.2.7 Statistische Analyse

Das kumulative Überleben wurde nach der Kaplan-Meier Methode ab dem Tag der Operation bestimmt. Die Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden mit dem Mantel-Cox Log-Rang-Test analysiert. Für Zusammenhänge zwischen kontinuierlichen und kategorialen Variablen wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Univariate und multivariate Regressionsanalysen wurden mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. Die biologischen und pathologischen Variablen wurden als dichotomisierte (kategoriale) Variablen verwendet: T₃ und T₄ versus T₂ und T₁, N₂ und N₃ versus N₀ und N₁, Grading (G₃ versus G₁ und G₂), Alter (Median als Schwellenwert: > 67 versus ≤ 67), Geschlecht (männlich versus weiblich), Chemotherapie (ja versus nein), Tumorlokalisation (Rektum versus andere), p53 Mutation (ja oder nein), Bax-Expression (hoch versus niedrig),

p16^{INK4a}-Expression (hoch versus niedrig) und die p53/Bax-Interaktionsvariable. Für die immunhistochemische Analyse wurde der mediane Färbeindex der Bax-Expression bzw. der p16^{INK4a}-Expression als Schwellenwert, d.h. Werte \geq medianer Färbeindex wurden als „hohe Expression“ und Werte $<$ medianer Färbeindex als „niedrige Expression“, definiert (Altman *et al.*, 1994). Für die multivariate Regressionsanalyse des Überlebens wurde das Cox-Regressionsmodell angewendet. Die kategorialen Variablen wurden dabei schrittweise vorwärts und rückwärts ausgewählt, abhängig von Änderungen des Likelihood-Quotienten zwischen den verschiedenen Parametern. Als Signifikanzniveau für den β -Fehler wurde $p < 0,05$ definiert.

2.3 Geräte, Zubehör und Reagenzien

2.3.1 Geräte und Zubehör

96-well-Platten	TTP, Trasadingen, CH
Agarose Elektrophoresezubehör, Zubehör	BioRad, München, D
Automated Gel Stainer	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Deckgläser	Merck, Darmstadt, D
DNA-Thermocycler [®] 2400, 9700	Perkin-Elmer/Cetus, Weiterstadt, D
Eindeckmedium ClariOn [®]	Biomeda, Fostercity, CA, USA
Elektrophoresekammer Multiphor II [®] , Zubehör	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Filterpapier	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Filterpapier, 1F	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
GelBondfilm [®]	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Glasplatten	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Klemmen Flexiclamps [®]	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Lichtmikroskop BX50	Olympus, Hamburg, D
Magnetrührer Monotherm [®]	Merck, Darmstadt, D
Mikrowellenherd	Merck, Darmstadt, D
Netzgeräte Power pack II [®]	BioRad, München, D
Objektträger Superfrost Plus [®]	Roth, Karlsruhe, D
PAP-Stift	Dako, Hamburg, D
Paraclear [®]	Merck, Darmstadt, D
Parafilm [™]	Merck, Darmstadt, D
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Perkin-Elmer, Weiterstadt, D
pH-Meter	Merck, Darmstadt, D

Pipetten 10,100,200,1000 μ l
 Pipettenspitzen
 Plastikpipetten 10, 25 ml
 Pipettenspitzen mit Filter
 Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml
 Schnellkochtopf
 Thermomixer 5436
 Tischzentrifuge C 5415
 Transluminator Geldoc 2000®
 Umwälzthermostat MultiTemp III™®
 Vortexer
 Wagen 3100s, 210s
 Zentrifugenröhrchen 50 ml

Merck, Darmstadt, D
 Merck, Darmstadt, D
 Corning Incorporated, Acton, USA
 Merck, Darmstadt, D
 Eppendorf, Hamburg, D
 Tefal, Offenbach, D
 Eppendorf, Hamburg, D
 Eppendorf, Hamburg, D
 BioRad, München, D
 Amersham Pharmacia Biotech AB,
 Uppsala, S
 Merck, Darmstadt, D
 Sartorius, Göttingen, D
 TPP, Trasadingen, CH

2.3.2 Reagenzien

Acryl-Bisacrylamid-Lösung 40 %, 29:1
 Agarose
 Agarosegel Ladungspuffer
 APS, Ammoniumperoxidisulfat 10 %
 Aqua bidest.
 Borsäure
 Blue-Xylene Cyanole Dye Solution
 DAB, Diaminobenzidin
 Essigsäure
 Ethanol 96 %
 EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure
 Ethidiumbromid 0,5 %
 Formamid
 Hämatoxylin
 Magnesiumchlorid
 TEMED, N,N,N-Tetramethylethylendiamin
 Natriumchlorid
 Natriumacetat
 Natriumhydroxid
 Natriumziträt
 n-Octan
 Reaktionspuffer (10 x NH₄, pH 8,8)
 Sea Block®™
 Stable Peroxide Substrate Buffer®
 Streptavidin-Peroxidase
 Trishydrochlorid
 Trishydroxylaminomethan
 Wasserstoffperoxid
 Xylol
 Zitronensäure

Roth, Karlsruhe, D
 Gibco BRL, Paisley, UK
 Sigma, München, D
 Fluka Bio Chimika, Buchs, CH
 Braun, Melsungen, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Sigma, München, D
 Pierce, Rockford, USA
 Roth, Karlsruhe, D
 Merck, Darmstadt, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Sigma, München, D
 Sigma, München, D
 Merck, Darmstadt, D
 Invitek, Berlin, D
 Fluka Bio Chimika, Buchs, CH
 Roth, Karlsruhe, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Sigma, München, D
 Invitek, Berlin, D
 Pierce, Rockford, USA
 Pierce, Rockford, USA
 Dianova, Hamburg, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Merck, Darmstadt, D
 Roth, Karlsruhe, D
 Roth, Karlsruhe, D

2.3.3 Puffer

EDTA, pH 8,0	146,125	g/l	EDTA
SSCP-Ladungspuffer	90,0	%	Formamid
	0,16	mM	Natriumhydroxid
	0,10	mM	EDTA, pH 8,0
	10,00	%	Blue-Xylene Cyanole Dye Solution
TAE-Puffer	40,00	mM	Trishydroxymethylaminomethan
	0,05	mM	Eisessig
	1,00	mM	EDTA, pH 8,0
			Aqua bidest.
TBE-Puffer	89,00	mM	Trishydroxymethylaminomethan
	89,00	mM	Borsäure
	2,00	mM	EDTA, pH 8,0
			Aqua bidest.
TBS-Puffer, pH 7,5	7,40	mM	Trishydroxymethylaminomethan
	43,50	mM	Trishydrochlorid
	150,00	mM	Natriumchlorid
			Aqua bidest.
PCR-Reaktionspuffer, pH 8,0	2,00	mM	Tris-HCL
	10,00	mM	KCl
	0,01	mM	EDTA
	0,10	mM	DTT
	5,00	%	Glycerin
	0,05	%	Tween 20
	0,05	%	Nonidet-P40
Zitratpuffer, pH 6,0	0,10	M	Zitronensäure
	0,10	M	Natriumcitrat
			Aqua bidest.

2.3.3.1 Kits

Invisorb® Spin Tissue Kit
Plus one® DNA Silverstaining Kit

Invitex, Berlin, D
Amersham Pharmacia Biotech AB,
Uppsala, S

2.3.4 Enzyme und Nukleotide

dATP, dGTP, dTTP, dCTP	12,50	mM	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S
Taq DNA Polymerase	5,00	U/ μ L	Invitex, Berlin, D

2.3.5 Antikörper und Zelllinien

Antikörper gegen humanes **p16INK4a-Protein** (monoklonales Maus-IgG1), Klon G175-405, (Pharmingen, USA). 0,5 mg/ml auf 1:150 bzw. 0,003 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt.

Antikörper gegen humanes **Bax-Protein** (monoklonales Maus-IgG1), Klon YTH-2D2 (Trevigen, USA). 25 μ g/ μ l auf 1:750 bzw. 0,003 μ g/ μ l in TBS-Puffer verdünnt.

Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG und IgM (H+L), polyklonaler Antikörper (Jackson ImmunoResearch, USA). 1,6 mg/ml auf 1:250 bzw. 0,006 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt.

Peroxidase-conjugated-Streptavidin (Jackson ImmunoResearch, USA). 1,0 mg/ml, auf 1:500 bzw. 0,02 mg/ml in TBS-Puffer verdünnt.

LoVo, humane Kolonkarzinomzelllinie.

2.3.6 Computersoftware

Quantity One 4.0.2	BioRad
StatView 5.0	Apple/Macintosh

3 Ergebnisse

3.1 Follow up

In dieser Analyse wurden 116 Patienten mit CRC im UICC Stadium III und IV nach Tumoresektion untersucht. Für das Follow-up wurden die Patienten für 17 Monate (Range 1-112; Mittelwert 42,1; Standardfehler $\pm 3,9$) im Median nachbeobachtet. 24 Patienten waren zum Nachbeobachtungszeitpunkt noch am Leben und weitere 10 Patienten waren an tumorassoziierten Todesursachen verstorben (Grabowski *et al.*, 2001). Diese 34 Patienten wurden als zensiert bezeichnet und in alle Analysen eingeschlossen. Patienten im Stadium III überlebten für die Zeitspanne von Diagnose bis zum Zensierungszeitpunkt im Median 69 Monate (Range 4-112), im Stadium IV hingegen nur 8 Monate (Range 1-84). Das mediane Überleben der 34 zensierten Patienten beträgt 83,5 Monate (Range 9-112). Im Stadium III überlebten 90 % das erste postoperative Jahr (geschätzte 1-Jahresüberlebensrate nach Kaplan-Meier), im Stadium IV nur 35 % der Patienten (**Abb. 5**).

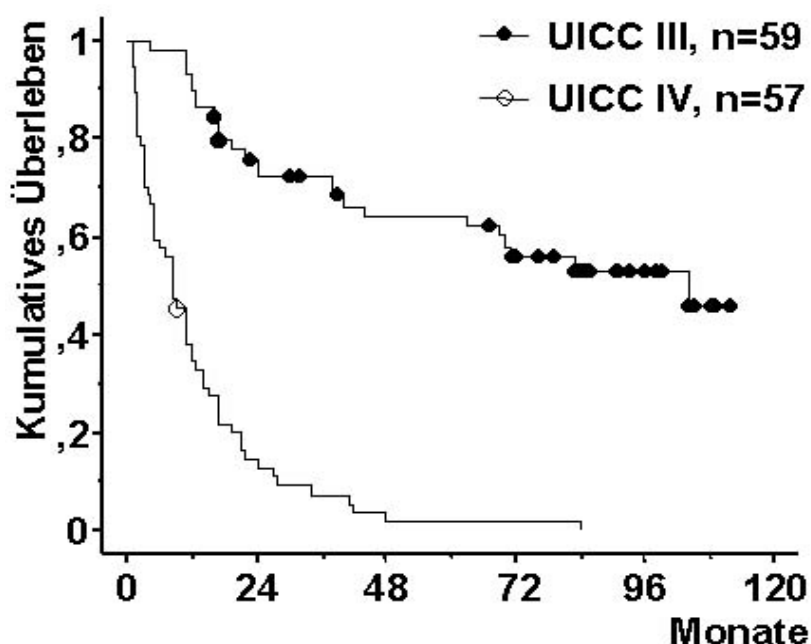


Abbildung 5: Kumulatives Überleben im Stadium III und IV.

Die 5-Jahresüberlebensraten betrugen im Stadium III 64,5 % und im Stadium IV 2 %. Das kumulative Überleben der Patienten im Stadium III und IV unterschied sich, wie zu

erwarten, signifikant (Mantel-Cox Log-Rang-Test: $p < 0,0001$). Deshalb wurden die folgenden Analysen stadienspezifisch durchgeführt.

3.2 Analyse der p53-Mutationen

P53 ist ein transkriptioneller Aktivator des Bax-Gens (Miyashita und Reed, 1995). Um die Abhängigkeit der Expression von Bax vom p53-Status zu untersuchen, wurde nach Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne des p53-Gens unter Anwendung der SSCP-PCR gesucht. Mehr als 90 % der p53-Missense-Mutationen maligner Tumore befinden sich in der Core-Domäne, welche sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ermöglicht. Durch die SSCP-Analyse wurden in 46 von 116 (39,7 %) Tumورproben aberrierende Bandenmuster gefunden (**Abb. 6**). Zwei Tumore enthielten Mutationen in 2 Exonen. Im Stadium III sind 28 von 59 Tumoren (47,5 %) mutiert, im Stadium IV waren es 18 von 57 Tumoren (31,6 %).

	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Summe
Mutationen (n)	15	10	15	8	$\Sigma = 48/116$

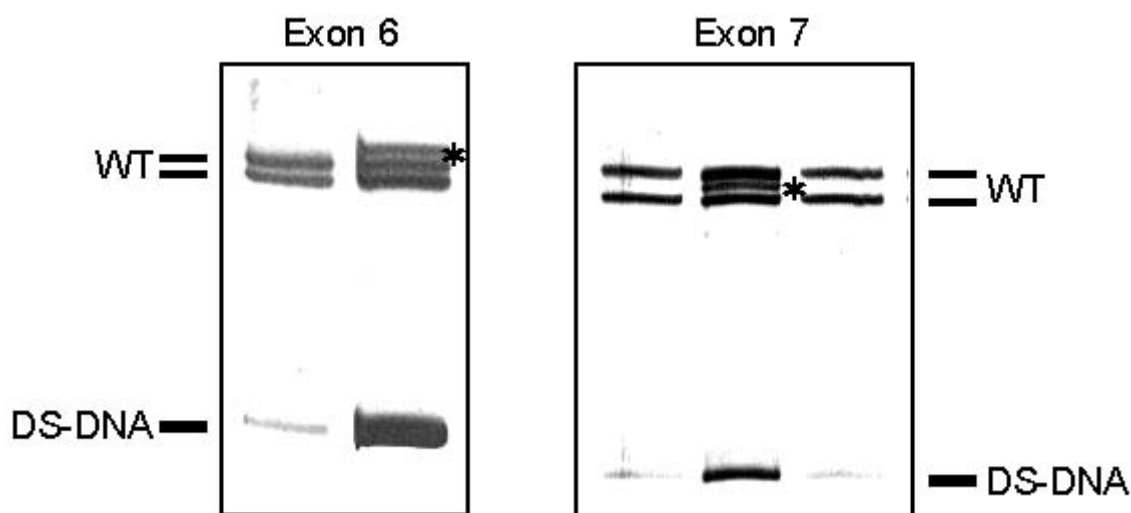


Abbildung 6: SSCP-PCR.

Anmerkung: Exon 6 Wildtyp, Mutation und Exon 7 Wildtyp und Mutation. WT Wildtyp, DS-DNA Doppelstrang-DNA, * aberrierende Bande.

3.3 Analyse der Bax-Expression

Das Bax-Protein wird in vielen Geweben exprimiert, und zwar besonders in denen, die einen hohen Zellumsatz aufweisen. In normalen Kolonzellen ist die Bax-Färbung in den superfizialen epithelialen Zellen stärker und hauptsächlich intrazellulär (Krajewski *et al.*, 1994) mit diffus zytoplasmatischem Färbemuster. In dieser Studie war das normale Färbemuster für den Bax-Antikörper deutlich diffus zytoplasmatisch und in einigen Fällen schwach nukleär, wobei die Zellen an der luminalen Oberfläche eine stärkere teilweise auch leicht granuläre Expression aufweisen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren und vorangegangenen Analysen (Sturm *et al.*, 1999) wurde nur die zytoplasmatische Färbung ausgewertet (**Abb. 7 a,b, Tab. 13**). Die Tumorzellen, die keine zytoplasmatische Färbung zeigten, wurden als negativ gewertet. Nur einer der 116 Tumore zeigt weder zytoplasmatische noch nukleäre Bax-Expression.

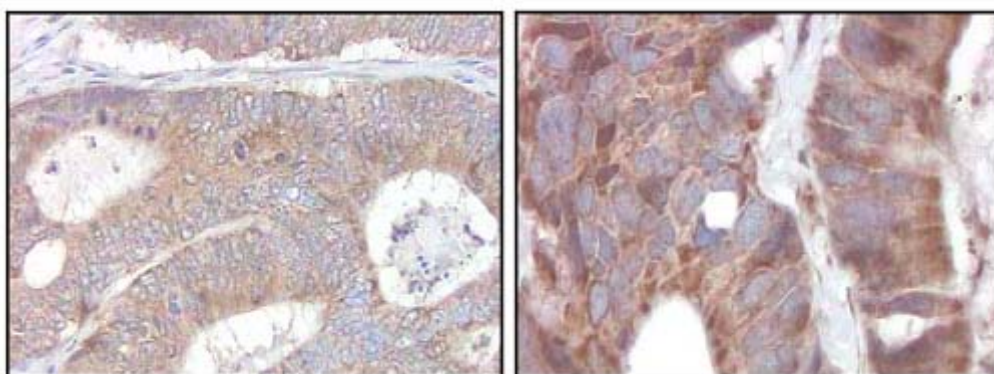


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung des Bax-Proteins in kolorektalen Adenokarzinomen 200x, 400x

Tabelle 13: Immunhistochemische Bax-Färbung von UICC III- und IV-Tumoren

	medianer FI Bax	Range
UICC III und IV, n=116	123,0	0-295
UICC III, n=59	112,5	29-289
UICC IV, n=57	152,0	0-295

Anmerkung: Werte als Absolutwerte. FI Färbeindex, UICC Union Internationale Contre le Cancer.

Die Assoziation der Bax-Expression (Färbeindex 0 - 300; kontinuierliche Variable) mit den univariaten Parametern Infiltrationstiefe (pT_{1-4}), Lymphknotenbefall (pN_{0-3}) und Differenzierungsgrad (G₁₋₃) wurde mit dem Mann-Whitney U-Test untersucht (**Abb. 8**).

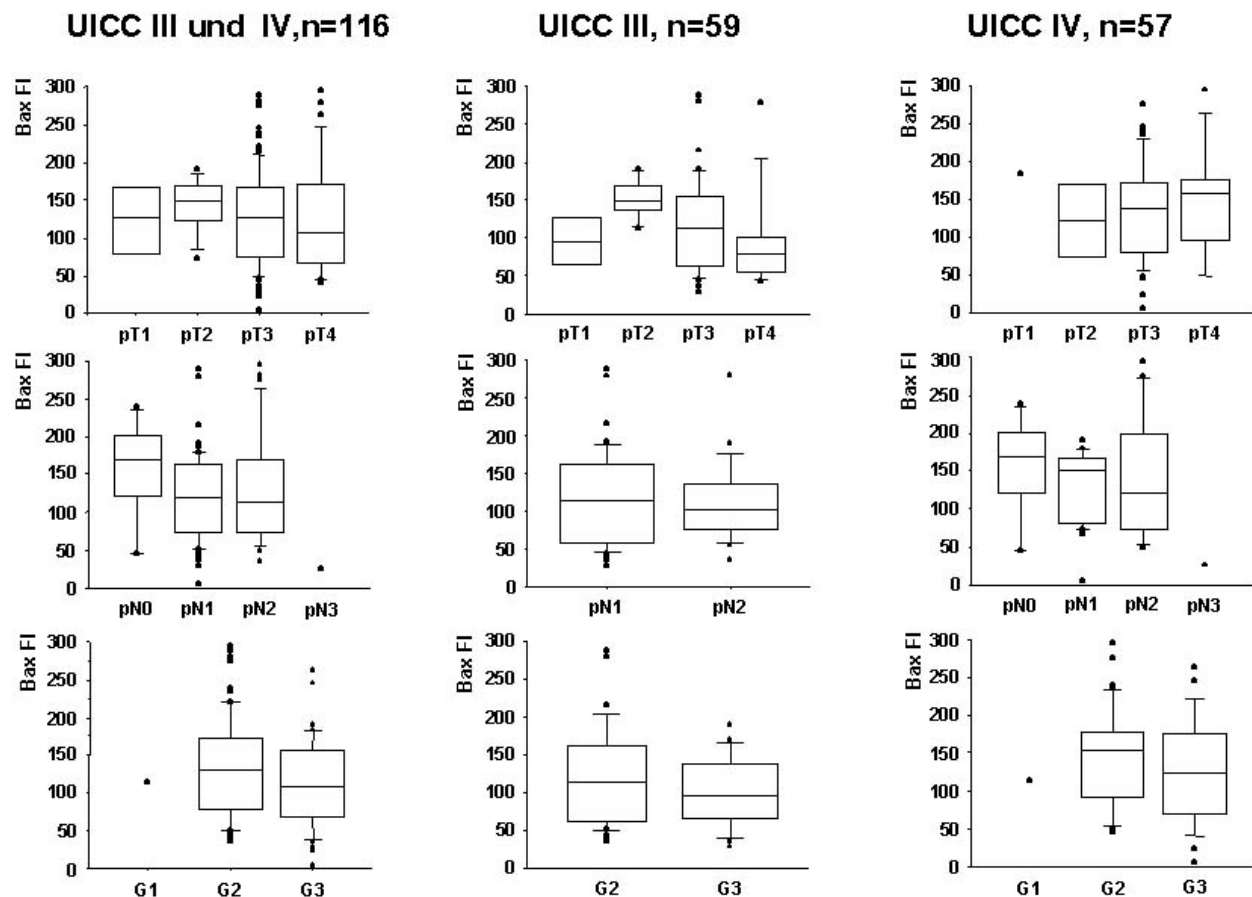


Abbildung 8: Boxplotanalyse des Bax-Färbeindex (FI) in Relation zum pT-, bzw. pN-Stadium und dem Differenzierungsgrad

Im Stadium III ist eine signifikante Abnahme der Bax-Expression bei Zunahme der Infiltrationstiefe von pT_2 zu pT_4 ($p=0,0192$), eine tendenzielle Abnahme bei fortschreitendem Lymphknotenstatus von pN_1 zu pN_2 sowie die Entdifferenzierung von G_2 zu G_3 zu erkennen. Im Stadium III existiert jeweils kein pN_0 sowie kein G_1 -Tumor. Die Zusammenhänge zwischen Bax-Expression Lymphknoteninfiltration und Differenzierungsgrad der Stadium III-Tumore sind jedoch bei Anwendung des Mann-Whitney U-Tests nicht signifikant. Im Stadium IV sind die Tendenzen ähnlich, eine Verminderung der Proteinexpression bei Anstieg von pN_0 zu pN_3 sowie von G_2 zu G_3 sind zu erkennen. Sturm *et al.* konnten ebenso bei der Untersuchung der Bax-Expression in Lebermetastasen CRC die Tendenz zu schwächerer Bax-Expression in G_3 Tumoren und Tumoren mit höherem Lymphknotenstatus zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beobachten (Sturm *et al.*, 1999). Für die weitere Auswertung wurden die Patienten an Hand des Färbeindex der Bax-Expression mit dem Median als Grenzwert in 2 Gruppen kategorisiert. Werte

größer als der mediane Färbeindex (UICC III: 112,5; UICC IV: 152) wurden nach Altman *et al.* (Altman *et al.*, 1994) als „hohe Expression“ und Werte kleiner als der mediane Färbeindex als „niedrige Expression“ festgelegt. Die Bax^{hoch}-Gruppe bestand im Stadium III aus 30 Patienten, im Stadium IV aus 29 Patienten. Die Bax^{niedrig}-Gruppe bestand im Stadium III aus 29 Patienten und im Stadium IV aus 28 Patienten. 40 Patienten wurden neben der Tumorresektion zusätzlich mit einer Strahlentherapie, adjuvanter oder palliativer Chemotherapie behandelt, wobei ein Patient sowohl eine neoadjuvante Strahlentherapie als auch eine palliative Chemotherapie erhielt. Im Stadium III erhielten 21 der 59 Patienten eine zusätzliche Therapie und verteilten sich gleichmäßig auf die Bax^{hoch}- (n=11) und die Bax^{niedrig}-Gruppen (n=10). Im Stadium IV erhielten 20 der 57 Patienten eine zusätzliche Therapie und verteilten sich ebenfalls gleichmäßig auf die Bax^{hoch}- (n=11) und die Bax^{niedrig}-Gruppe (n=9).

3.4 Analyse der p16^{INK4a}-Expression

Das p16^{INK4a}-Protein ist in Tumorproben durch immunhistochemische Färbung sowohl nukleär als auch in einigen Proben zytoplasmatisch lokalisierbar (**Abb. 9 a,b, Tab. 14**).

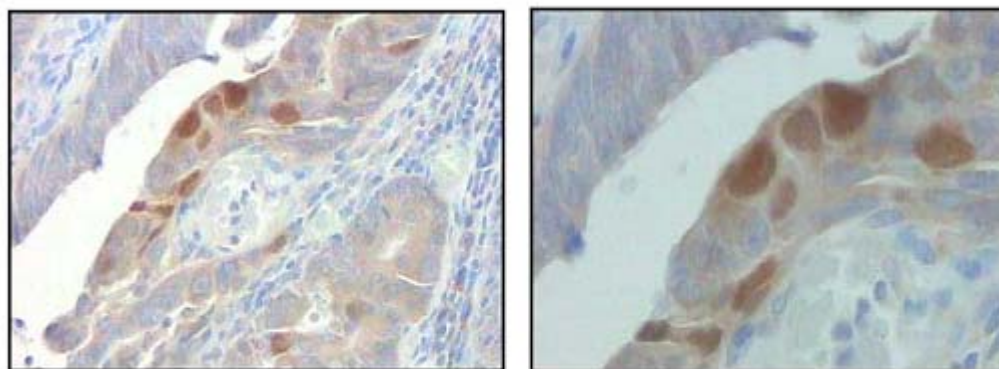


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung des p16^{INK4a}-Proteins in kolorektalen Adenokarzinomen 200x, 400x

Hier wurde nur die nukleäre Proteinexpression untersucht (Ruas und Peters, 1998). Die p16^{INK4a}-Expression war deutlich niedriger als die Bax-Expression. Jeweils ein Stadium III- und ein Stadium IV-Tumor der 116 Tumoren zeigte weder zytoplasmatische noch nukleäre Proteinexpression.

Tabelle 14: Immunhistochemische p16^{INK4a}-Färbung von UICC III- und IV-Tumoren

	medianer FI p16 ^{INK4a}	Range
UICC III und IV, n=116	9,23	0-300
UICC III, n=59	6,50	0-300
UICC IV, n=57	13,90	0-239

Anmerkung: Werte als Absolutwerte. FI Färbeindex, UICC Union Internationale Contre le Cancer.

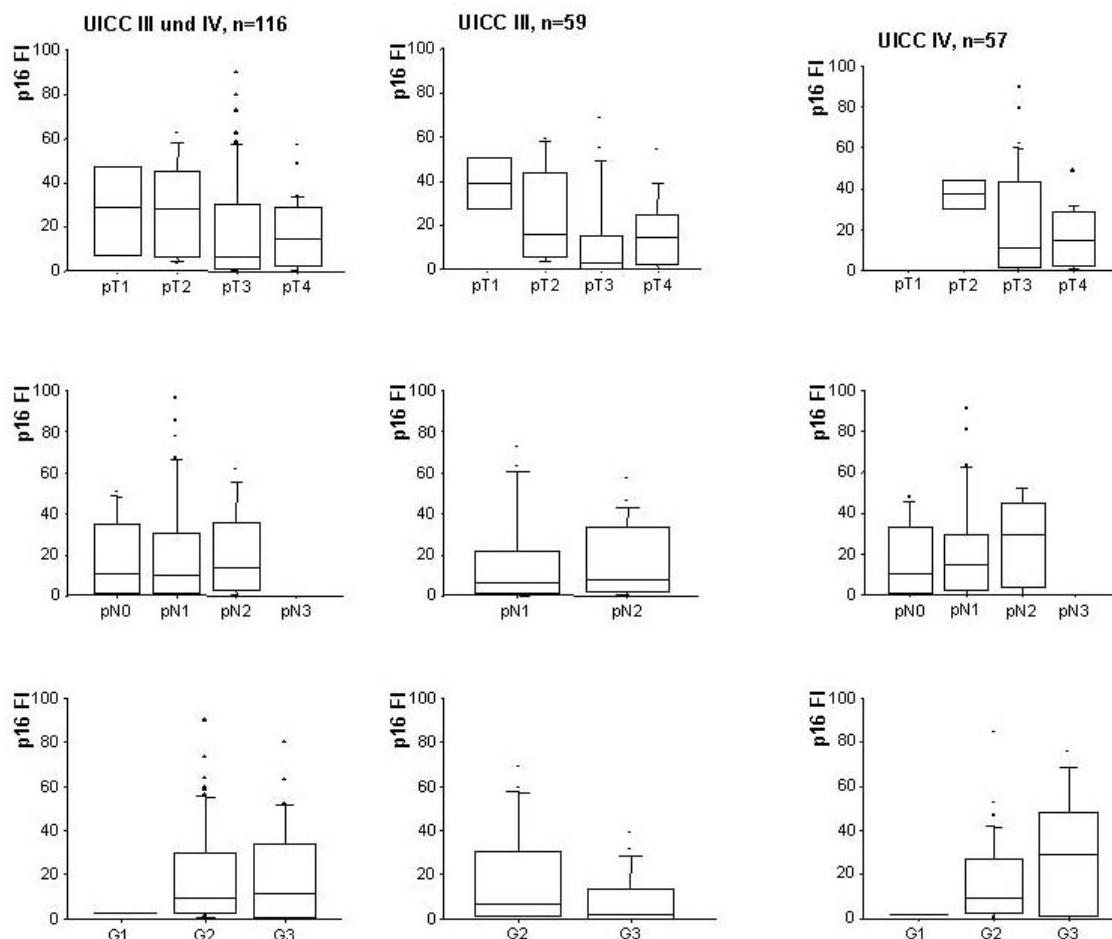


Abbildung 10: Boxplotanalyse des p16^{INK4a}-FI (Färbeindex) in Relation zu pT-, pN-Stadium und Differenzierungsgrad

Der Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression (Färbeindex, 0 - 300 bzw. %-gefärbte Zellen, 0 – 100 %; kontinuierliche Variablen) und den kategorialen Variablen Infiltrationstiefe (pT₁₋₄), Lymphknotenstatus (pN₀₋₃) und der Differenzierungsgrad (G₁₋₃) wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test bestimmt (**Abb. 10, 11**).

Bei Tumoren im Stadium III wurde, wie auch bei der Bax Expression (**Abb. 10**), eine Tendenz zu verminderter p16^{INK4a}-Expression bei der Progression von pT₁ zu pT₄ sowie

G₂ zu G₃ deutlich. Bei Anstieg des Lymphknotenstatus von pN₁ zu pN₂ steigt die p16^{INK4a}-Expression minimal an. Der Zusammenhang der p16^{INK4a}-Expression mit den Variablen ist im Mann-Whitney U-Test nicht signifikant. Im Stadium IV ist p16^{INK4a}-Expression anders verteilt. Bei Zunahme der Lymphknoteninfiltration von pN₀ zu pN₃ steigt die p16^{INK4a}-Expression deutlich an. Auch bei Zunahme der Entdifferenzierung war ebenso eine stärkere p16^{INK4a}-Expression zu erkennen (G₃ versus G₂). Auch diese Ergebnisse sind nur Trends und hatten keine statistische Signifikanz.

Für die weitere Auswertung wurde der Färbeindex der p16^{INK4a}-Expression durch den Median in 2 Gruppen geteilt. Werte größer als der mediane Färbeindex (UICC III: 6,5; UICC IV: 13,9) wurden nach Altman *et al.* (Altman *et al.*, 1994) als „hohe Expression“ und Werte kleiner als der mediane Färbeindex als „niedrige Expression“ festgelegt. Die p16^{hoch}-Gruppe bestand aus 30 Patienten im Stadium III und 29 Patienten im Stadium IV. Die p16^{niedrig}-Gruppe bestand aus 29 Patienten im Stadium III und 28 Patienten im Stadium IV. 40 Patienten erhielten eine zusätzliche präoperative Strahlentherapie, adjuvante oder palliative Chemotherapie, wobei ein Patient im Stadium IV sowohl eine präoperative Strahlentherapie als auch eine palliative Chemotherapie erhielt. Diese 21 zusätzlich therapierten Patienten im Stadium III (n=59) verteilten sich gleichmäßig auf beide Tumorstadien. Zehn der Stadium III-Tumore zeigten eine starke p16^{INK4a}-Expression und 11 Stadium III-Tumoren eine schwache p16^{INK4a}-Expression. Bei den 19 zusätzlich therapierten Patienten im Stadium IV zeigten 13 Tumore eine starke p16^{INK4a}-Expression und sechs eine schwache.

Die prozentuale Analyse der p16^{INK4a}-Expression bei Tumoren im Stadium III zeigte (**Abb. 11**), wie auch beim p16^{INK4a}-Färbeindex, lediglich eine Tendenz zu verminderter p16^{INK4a}-Expression bei Progression von pT₁ zu pT₄ sowie G₂ zu G₃. Bei Anstieg des Lymphknotenstatus von pN₁ zu pN₂ steigt die p16^{INK4a}-Expression minimal an. Der Zusammenhang der prozentualen p16^{INK4a}-Expression mit den Variablen ist im Mann-Whitney U-Test nicht signifikant. Für die weiteren Analysen wurde daher der p16^{INK4a}-Färbeindex verwendet.

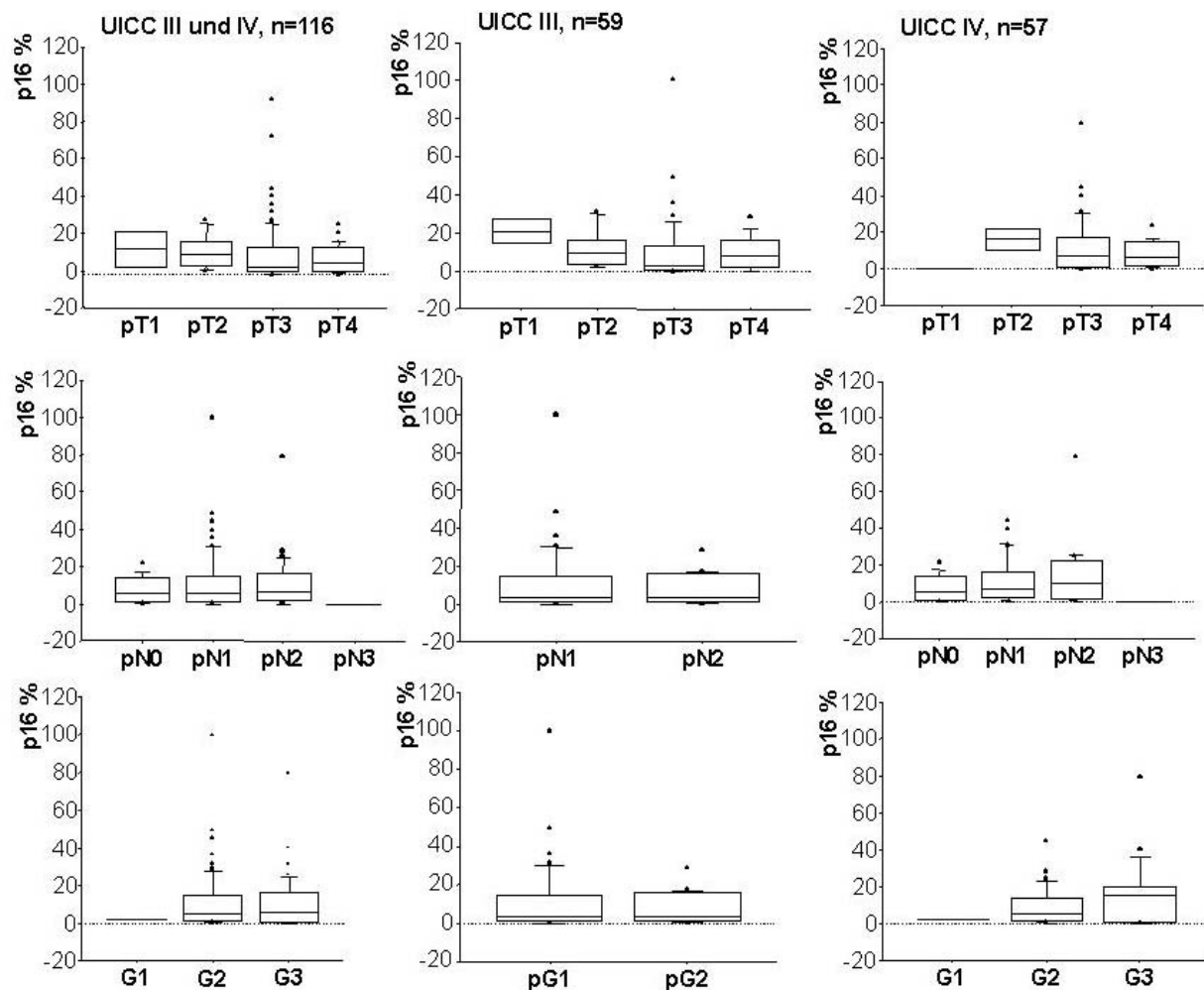


Abbildung 11: Boxplotanalyse der prozentualen p16^{INK4a}-Expression in Relation zu pT-, pN-Stadium und Differenzierungsgrad

3.5 Zusammenhang zwischen p53-Mutationen und Bax-Expression

Da p53 ein transkriptioneller Aktivator des Bax-Gens ist, wurde der Zusammenhang von p53-Mutationen und der Bax-Proteinexpression untersucht (**Abb.12 a,b,c, Tab. 15**).

Tabelle 15: Bax-Färbung in Abhängigkeit vom p53-Status

	medianer FI (Bax)	Range
p53 Mutation, n=46	121	0 - 190
p53 WT, n=70	128	24 - 295

Anmerkung: Werte als Absolutwerte. FI Färbeindex, WT Wildtyp.

Wie schon in anderen Arbeiten zum Kolon- und Mammakarzinom sowie zur Bax-Promotorregulation (Thornborrow und Manfredi, 1999) gezeigt werden konnte, hat der p53-Mutationsstatus keinen Einfluss auf die Bax-Expression ($p > 0,05$).

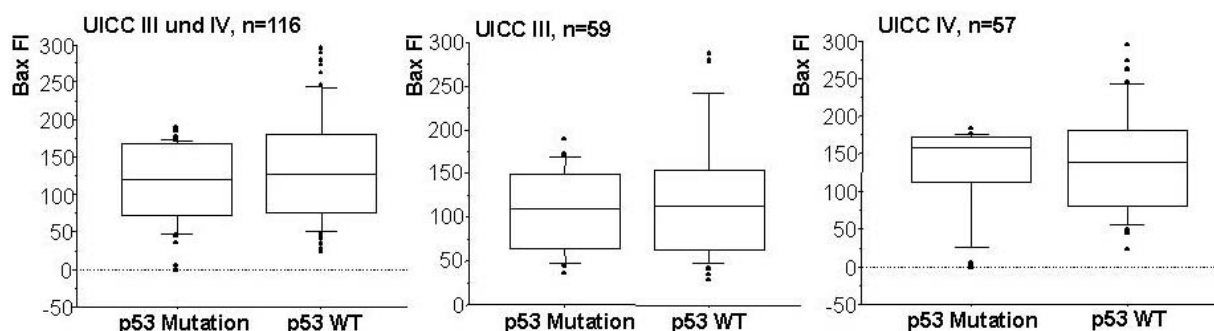


Abbildung 12a,b,c: Boxplotanalyse des Bax-FI in Relation zum p53-Mutationsstatus von UICC III und IV-, UICC III- und UICC IV-Tumoren.

3.6 Einfluss von p53, Bax und p16^{INK4a} auf das Gesamtüberleben

3.6.1 p53-Mutationsstatus und Gesamtüberleben

Für Patienten im Stadium III unterscheidet sich das kumulative Gesamtüberleben mit p53-Mutation (n=31) nicht signifikant vom Überleben der Patienten mit p53-Wildtyp (n=28) (Mantel-Cox Log-Rang-Test: $p = 0,11$).

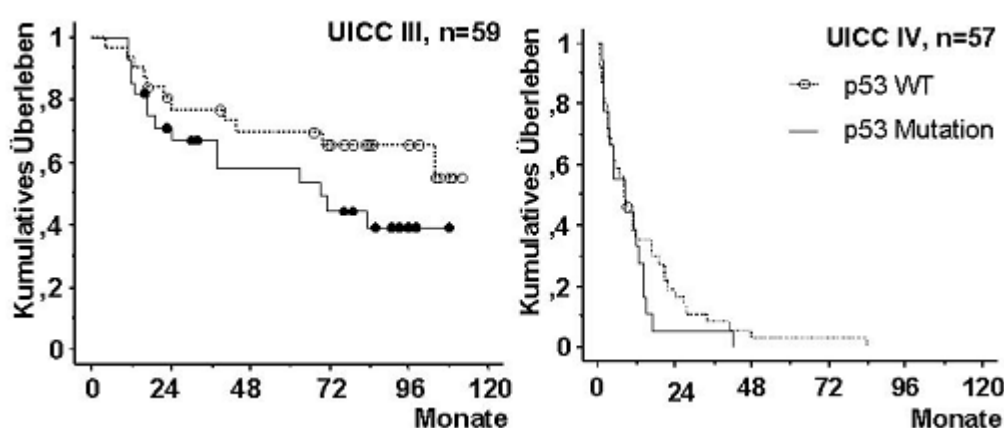


Abbildung 13a,b: p53-Mutationsstatus und kumulatives Gesamtüberleben

Allerdings besteht eine Tendenz zu längerem Überleben der Patienten mit p53-Wildtyp

Tumoren (**Abb. 13a**). Im Stadium IV gibt es einen tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Unterschied (Mantel-Cox Log-Rang-Test: $p=0,31$) des Überlebens von Patienten mit p53-mutierten ($n=18$) und p53-Wildtyp Tumoren (**Abb. 13b**).

3.6.2 Bax-Expression und Gesamtüberleben

Um den prognostischen Wert der Bax-Expression zu bestimmen, wurde die Proteinexpression als dichotomisierte Variable in hohe und niedrige Bax-Expression unterteilt (Kap. 2.2.7). Bei Patienten im Stadium III ($n=59$) und niedriger Bax-Expression ($n=29$) kann eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit (medianes Überleben 23,6 Monate) als bei Patienten mit hoher Bax-Expression ($n=30$) (medianes Überleben 77,5, Monate) beobachtet werden. Der Mantel-Cox Log-Rang-Test ist für diesen Zusammenhang signifikant, $p=0,009$ (**Abb. 14a**).

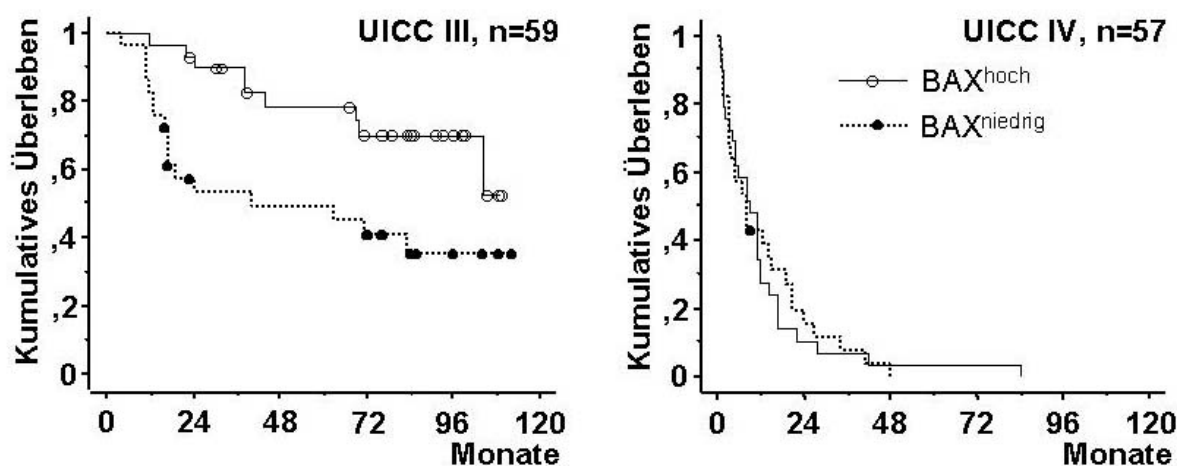


Abbildung 14a,b: Überleben im Stadium III und IV nach Kaplan-Meier

Der Mantel-Cox Log-Rang-Test ist für diesen Zusammenhang signifikant, $p=0,009$ (**Abb. 14a**). Bei Patienten im Stadium IV hat die Bax-Expression jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben, $p > 0,05$ (**Abb. 14b**).

3.6.3 p53/Bax-Status und Gesamtüberleben

In einer Studie zum Gesamtüberleben nach Lebermetastasenresektion von CRC in kurativer Intention zeigte die Überlebensanalyse, dass für Tumore mit einem intakten p53-

Gen der Verlust der Bax-Expression prognostisch ungünstiger war. Deshalb wurde hier ermittelt, ob die Kombination des p53-Mutationsstatus und der Bax-Expression von prognostischer Relevanz für das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem CRC ist. Die Kaplan-Meier Analysen für Stadium III und IV wurden mit den dichotomisierten Variablen p53-Mutation/Bax^{hoch} versus p53-Mutation/Bax^{niedrig} sowie p53-Wildtyp/Bax^{hoch} versus p53-Wildtyp/Bax^{niedrig} durchgeführt.

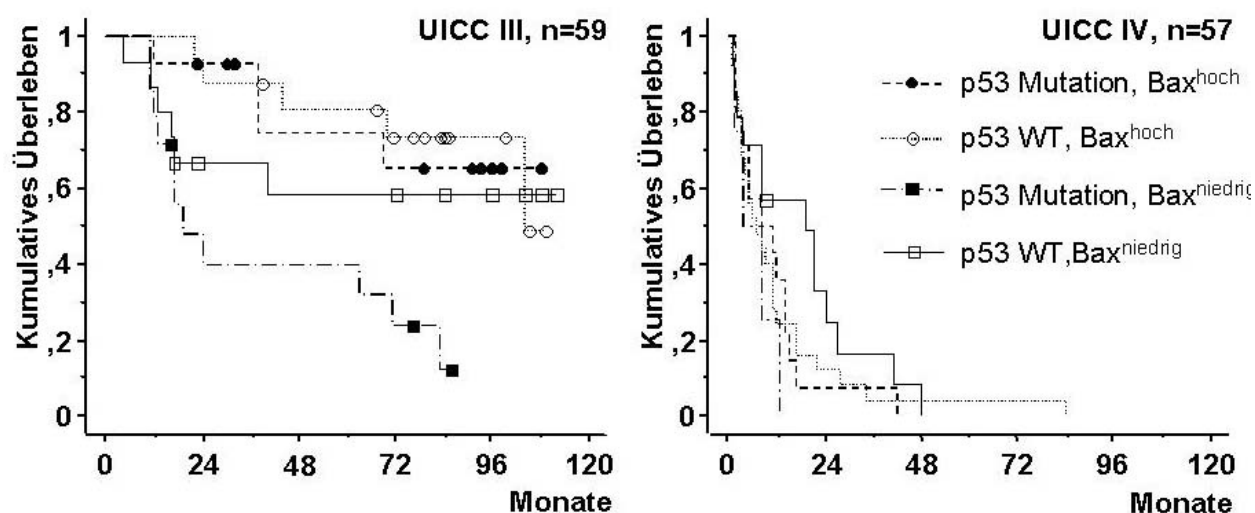


Abbildung 15a,b: p53-Status/Bax-Expression und kumulatives Überleben

Im Stadium III ist das Überleben mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 81,5 % in der p53-Wildtyp/Bax^{hoch}-Gruppe (n=16) am längsten. Im Gegensatz dazu beträgt die 5-Jahresüberlebensrate in der p53-Mutation/Bax^{niedrig}-Gruppe (n=14) nur 39,5 % (**Abb. 15a, Tab. 16**). Die 4 Kurven wurden mittels Mantel-Cox Log-Rang-Test mit 3 Freiheitsgraden verglichen. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander, $p=0,0043$. Die p53-Mutation/Bax^{niedrig}-Gruppe zeigt einen deutlich schlechteren Verlauf als die anderen 3 Gruppen. Das mediane Überleben in der p53-Mutation/Bax^{niedrig}-Gruppe beträgt 18 Monate versus 77,5 Monate medianes Überleben in der p53-Wildtyp/Bax^{hoch}-Gruppe. Im Stadium IV zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Überleben der Gruppen (Mantel-Cox Log-Rang-Test: $p=0,32$). Das Überleben der p53-Wildtyp/Bax^{hoch}-Gruppe, die aus 25 Patienten besteht, differiert nur geringfügig von den anderen 3 Gruppen (**Abb. 15b**). Trotzdem zeigt die Patientengruppe mit p53-Mutation/Bax^{niedrig}-exprimierenden Tumoren die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit.

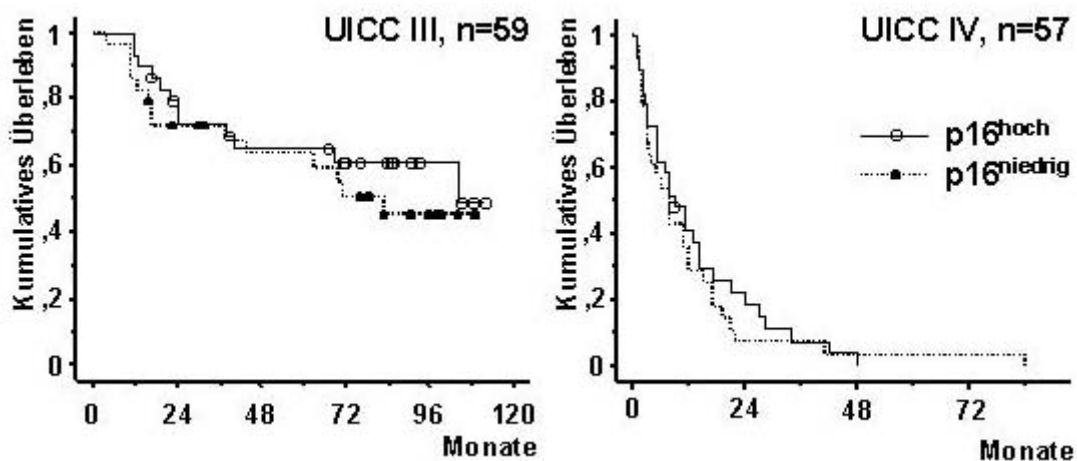
Tabelle 16: 1-, 2- und 5-Jahresüberlebensrate und p53- und Bax-Status

UICC III	1-JÜR	2-JÜR	5-JÜR
Alle	90,0	74,0	64,5
p53 WT/Bax ^{hoch}	100,0	87,5	81,5
p53 Mut/Bax ^{hoch}	92,5	92,5	74,5
p53 WT/Bax ^{niedrig}	86,5	66,5	59,5
p53 Mut/Bax ^{niedrig}	78,5	39,5	39,5
UICC IV			
Alle	35,0	13,0	2,0
p53 WT/ Bax ^{hoch}	26,0	10,5	5,0
p53 Mut/ Bax ^{hoch}	30,0	10,0	0,0
p53 WT/ Bax ^{niedrig}	45,0	22,5	0,0
p53 Mut/ Bax ^{niedrig}	37,7	0,0	0,0

Anmerkung: Werte: % Überleben. WT Wildtyp, Mut Mutation, FI Färbeindex, JÜR Jahresüberlebensrate.

3.6.4 p16^{INK4a}-Expression und Gesamtüberleben

Um die prognostische Relevanz der p16^{INK4a}-Expression zu bestimmen, wurde der Expressionsgrad als dichotomisierte Variable in hohe und niedrige Proteinexpression kategorisiert. Die Kriterien für die Dichotomisierung sind in Kapitel 2.2.7 dargestellt. Für die 59 Patienten im Stadium III hat der Färbeindex der p16^{INK4a}-Expression keine prognostische Relevanz.

Abbildung 16a,b: p16^{INK4a}-Expression und kumulatives Überleben

Das mediane Überleben der Patienten mit Tumoren niedriger (n=29) und hoher p16^{INK4a}-Expression (n=30) unterscheidet sich nur gering (p=0,41). Es ist eine Tendenz zu kürzerem Überleben der p16^{niedrig}-Gruppe zu erkennen (**Abb. 16a**). Das mediane

Überleben beträgt 63 versus 70 Monate ($p16^{\text{niedrig}}$ versus $p16^{\text{hoch}}$).

Im Stadium IV hat die $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression ebenfalls keine prognostische Relevanz (**Abb. 16b**). 28 Tumore zeigen niedrige und 29 Tumoren hohe $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression, $p=0,56$. Dennoch ist ein Trend zu längerem Überleben der Patienten mit hoher $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression zu erkennen.

3.6.5 $p53/p16^{\text{INK4a}}$ -Status und Gesamtüberleben

Da $p53$ und $p16^{\text{INK4a}}$ bei der Induktion von Apoptose und Zellzyklus kooperieren können, wurde hier die Kombination der 4 Parameter, $p53\text{-WT}/p16^{\text{hoch}}$, $p53\text{-WT}/p16^{\text{niedrig}}$, $p53\text{-Mutation}/p16^{\text{hoch}}$ und $p53\text{-Mutation}/p16^{\text{niedrig}}$, für die Stadium III-Tumore analysiert.

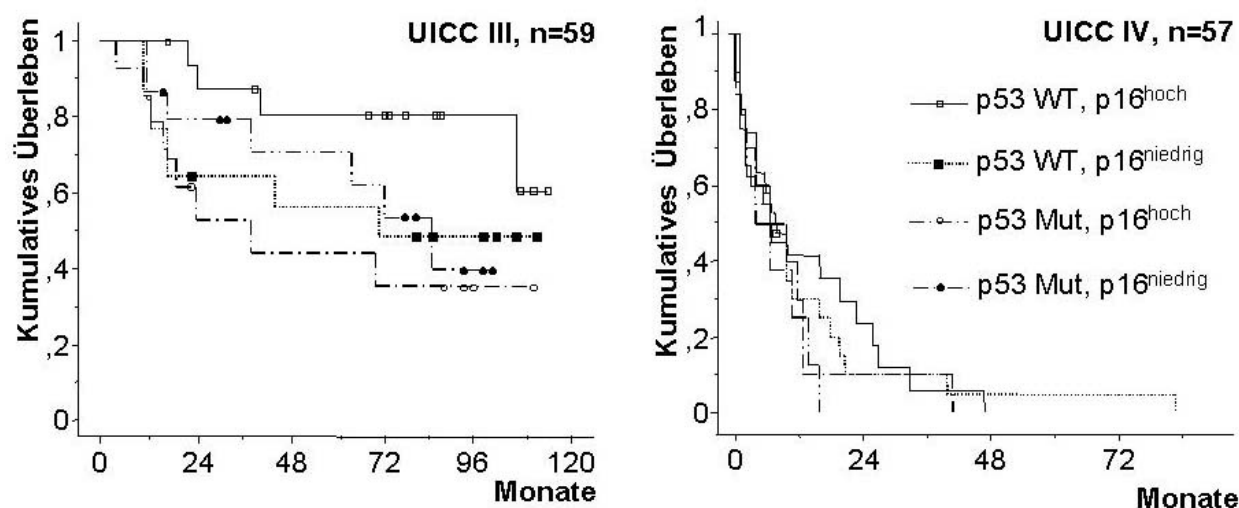


Abbildung 17a,b: $p53/p16^{\text{INK4a}}$ -Status und Überleben im Stadium III und IV

In **Abbildung 17a** lässt sich eine bessere Prognose für die $p53\text{-WT}/p16^{\text{hoch}}$ -Gruppe erkennen. Das kumulative Überleben der $p53\text{-WT}/p16^{\text{hoch}}$ -Gruppe differiert von den anderen 3 Gruppen (Breslow-Gehan-Wilcoxon-Test $p=0,04$; Mantel-Cox Log-Rang-Test jedoch nicht signifikant, $p=0,09$). Das mediane Überleben beträgt 24 versus 72 Monate ($p53\text{-Mutation}/p16^{\text{niedrig}}$ versus $p53\text{-WT}/p16^{\text{hoch}}$).

Da im Stadium IV (**Abb. 17b**) die $p53$ - und $p16^{\text{INK4a}}$ -Expression in der univariaten Analyse keine Signifikanz erreichen konnte, erschien eine Kombination der Parameter nicht sinnvoll.

3.6.6 Bax/p16^{INK4a}-Status und Gesamtüberleben

Um einen möglichen additiven Effekt der Bax- und p16^{INK4a}-Expression auf die klinische Prognose zu untersuchen, wurde die Gruppe der 59 Stadium III-Patienten entsprechend der Proteinexpression für Bax und p16^{INK4a} in 4 Gruppen kategorisiert. Der Mantel-Cox Log-Rang-Test konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufzeigen. In **Abbildung 18a** wird deutlich, dass nur die Bax-Expression von prognostischer Bedeutung ist, der Zusatz von p16^{INK4a} ergab keine weitere Auftrennung.

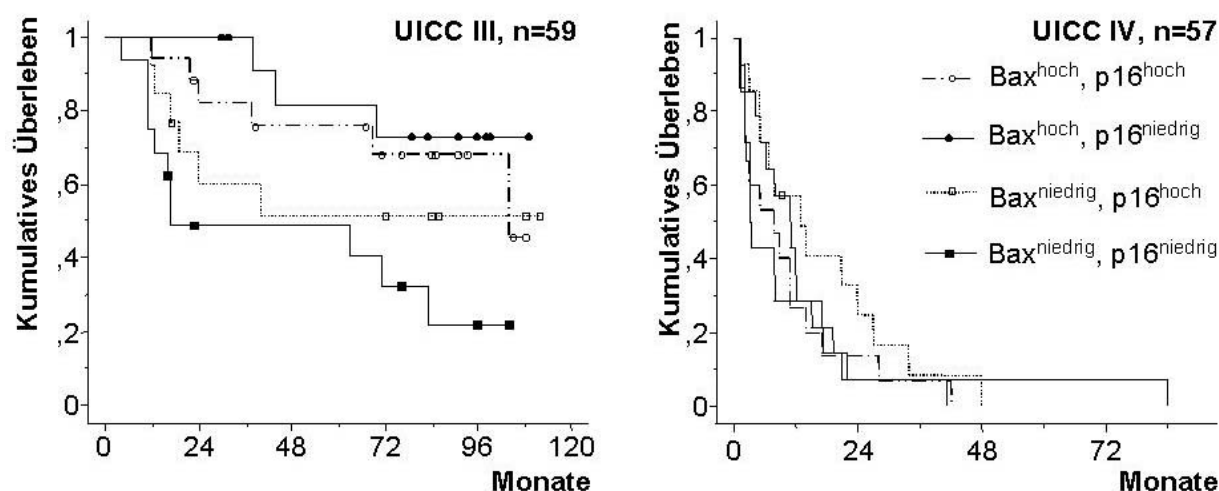


Abbildung 18a,b: Bax/p16^{INK4a}-Status und Überleben im Stadium III und IV

Auch im Stadium IV (**Abb. 18b**) konnte die Bax- und p16^{INK4a}-Expression in der univariaten Analyse das Signifikanzniveau nicht erreichen.

3.6.7 Uni- und Multivariate Regressionsanalyse

Mit der univariaten Regressionsanalyse der Patienten im Stadium III wurden die klinisch-pathologischen Variablen (Lokalisation [Rektum versus Kolosigmoid]; pN-Status [pN₂, pN₃ versus pN₀, pN₁]; T-Stadium [T₃, T₄ versus T₁, T₂]; Differenzierungsgrad [G₃ versus G₁, G₂]; Alter [> 67 Jahre versus ≤ 67 Jahre]; Geschlecht [männlich versus weiblich]; weitere Therapie [Therapie versus keine weitere Therapie]; p53 Mutation versus p53 Wildtyp; dichotomisierte Variablen für Bax^{hoch} und p16^{hoch}), die wahrscheinlich relevant für die Prognose von Patienten mit Stadium III-Tumoren sind, untersucht. Außer

dem wurde die p53 WT*Bax^{hoch}-Interaktionsvariable in die Analyse aufgenommen. In der univariaten Analyse erreichten die Variablen „Lokalisation“, „pN-Status“ und „Bax FI^{niedrig}“ sowie der „Interaktionsvariable: Baxhoch*p53 WT“ das Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Diese Variablen gehen mit einem erhöhten relativen Risiko für früheren Tod einher. Alle untersuchten Variablen sind in **Tabelle 17** zusammengefasst:

Tabelle 17: Univariate Regressionsanalyse für UICC III (n=59)

Variablen	RR	95 % KI	P _{univariat}
Lokalisation: Rektum	3,38	1,51- 7,54	<0,01
pN-Status: pN2+3	2,44	1,13- 5,29	0,02
T-Stadium: T3+4	1,98	0,47- 8,41	0,35
Differenzierung: G3	1,36	0,61- 2,40	0,45
Alter: >67	1,23	0,57- 2,66	0,60
Geschlecht: männlich	1,02	0,47- 2,23	0,96
weitere Therapie	2,06	0,95- 4,45	0,07
p53 Mutation	1,87	0,85- 4,12	0,12
Bax FI ^{schwach}	2,81	1,25- 6,32	0,01
p16 ^{INK4a} -FI ^{schwach}	1,38	0,64- 2,99	0,42
Interaktionsvariable: Bax ^{hoch} *p53 WT	2,90	1,09- 7,72	0,03

Anmerkung: FI Färbeindex, WT Wildtyp, RR relatives Risiko, KI Konfidenzintervall.

Die multivariate Regressionsanalyse zur Identifizierung negativer prognostischer Marker für Patienten im Stadium III wurde mit dem Cox-Modell durchgeführt. Dafür wurden die dichotomisierten Variablen schrittweise vorwärts und rückwärts ausgewählt. Unter Anwendung des Cox-Modells wurden hier drei unabhängige prognostische Faktoren für das CRC im Stadium III identifiziert: „pN-Status“, „Lokalisation: Rektum“, „Bax FI^{niedrig}“. Für Stadium III-Tumore ist eine schwache Bax-Expression von signifikant negativer prognostischer Relevanz mit einem 5,27-fach höheren Risiko für Tod ($p=0,0003$; **Tab. 18**). Das Signifikanzniveau erreichten außerdem die etablierten prognostischen Parameter „Tumorklassifikation im Rektum“ und „fortgeschrittenes N-Stadium“ (Cohen *et al.*, 1997) mit einem relativen Risiko von 5,40 bzw. 2,60.

Tabelle 18: Multivariate Regressionsanalyse für UICC III (n=59)

Variablen	RR	95% KI	P _{multivariat}
pN-Status: pN2+3	2,60	1,16- 5,79	0,02
Lokalisation: Rektum	5,40	2,23- 13,10	0,0002
Bax FI ^{niedrig}	5,27	2,14- 12,97	0,0003

Anmerkung: FI Färbeindex, KI Konfidenzintervall, RR relatives Risiko. UICC Union Internationale Contre le Cancer. Schrittweise Vorwärts- und Rückwärtsauswahl der Variablen.

Ebenso wurde eine univariate Regressionsanalyse für Patienten im Stadium IV durchgeführt. In der univariaten Analyse erreichte ein Parameter, Differenzierung „G3“ das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (**Tab. 19**). Da nur ein Parameter das Signifikanzniveau erreichte, konnte hier keine multivariate Analyse durchgeführt werden. Das Differenzierungsstadium „G3“ ist somit ein prognostischer Faktor für kolorektale Karzinome im Stadium IV. Das relative Risiko für Tod ist für diese Patienten um den Faktor 2,02 ($p=0,02$) erhöht.

Tabelle 19: Univariate Regressionsanalyse für UICC IV (n=57)

Variablen	RR	95% KI	p _{univariat}
Lokalisation: Rektum	0,64	0,31- 1,33	0,23
pN-Status: pN2+3	1,75	0,98- 3,12	0,06
T-Stadium: T3+4	1,35	0,41- 4,43	0,61
Differenzierung: G3	2,02	1,14- 3,59	0,02
Alter: >67	1,24	0,72- 2,18	0,44
Geschlecht: männlich	0,74	0,43- 1,26	0,27
weitere Therapie	0,98	0,56- 1,73	0,96
p53 Mutation	1,33	0,75- 2,38	0,33
Bax FI ^{schwach}	0,94	0,55- 1,60	0,82
p16 ^{INK4a} -FI ^{schwach}	1,16	0,68- 1,98	0,58
Interaktionsvariable: Bax ^{hoch} *p53 WT	0,57	0,26- 1,27	0,17

Anmerkung: FI Färbeindex, WT Wildtyp, RR relatives Risiko, KI Konfidenzintervall.

4 Diskussion

4.1 Prognostische Relevanz von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren für CRC

Die Entstehung von Tumoren ist ein multifaktorieller Prozess als Folge von Veränderungen zellulärer Mechanismen, die zu Dysregulation von Zellproliferation und Apoptose führen. Das p53-Gen ist ein transkriptioneller Regulator einer Vielzahl von Zellzyklusregulierenden und Apoptose induzierenden Genen (Daniel *et al.*, 2000; Kannan *et al.*, 2001). Das p53-Gen und das proapoptotische Bax-Gen, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, sind Regulatoren der Apoptosekaskade und sind somit möglicherweise für die Entstehung und Progression von malignen Erkrankungen entscheidend. Auch für die Therapie von Malignomen sind Apoptosesignalwege von zentraler Bedeutung. Zytotoxische Chemotherapien und Bestrahlung induzieren Apoptosesignalwege, wobei der mitochondriale DISC im Gegensatz zur Todesrezeptor vermittelten Apoptose bedeutender ist (Wieder *et al.*, 2001). Bei der onkogenen Transformation spielt auch die Dysregulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Innerhalb dieses Signalwegs hat das p16^{INK4a}-Gen eine regulatorische Funktion. Darüber hinaus scheinen p16^{INK4a} und p53 bei der Induktion von Zellzyklusarrest zu kooperieren (Sandig *et al.*, 1997).

Die verschiedenen Modelle der Apoptose- und Zellzyklusregulation basieren auf experimentellen Daten von artifiziellen Mausmodellen und Zelllinien. Ob diese Modelle auch auf humanes Tumorgewebe übertragen werden können und die gewonnenen Erkenntnisse von prognostischer Bedeutung für den Verlauf von Malignomen sind, bleibt Gegenstand der Forschung. Deshalb wurde hier die prognostische Relevanz von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren für CRC im Stadium III und IV untersucht.

4.1.1 p53-Mutationen sind für die Prognose nicht entscheidend

Bei der Suche nach Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne des p53-Gens wurden in der hier präsentierten Studie in 46 von 116 (39,7 %) Tumorproben genetische Alterationen nachgewiesen. Dieses Ergebnis liegt im Rahmen der zu erwartenden Häufigkeit von p53-Mutationen in CRC von 35 – 60 % (Hasegawa *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997). Dennoch hatten diese Mutationen keine prognostische Relevanz für den Krankheits

verlauf von Patienten im Stadium III oder IV. Der p53-Mutationsstatus ist somit kein unabhängiger Prognosefaktor für das kolorektale Adenokarzinom.

Die prognostische Relevanz von p53-Mutationen wird schon seit einiger Zeit für verschiedene Tumorentitäten untersucht. Als geeignete Methode zur Suche nach Mutationen wurden anfänglich immunhistochemische Färbemethoden gewählt. Es wurde angenommen, dass die p53-Proteinexpression eine Abgrenzung von p53-Wildtyp und mutiertem Protein ermöglichen kann. p53-mutiertes Protein wird stabilisiert - es hat eine längere Halbwertszeit - und kann deshalb im Gegensatz zum Wildtyp-Protein mittels immunhistochemischer Färbemethoden detektiert werden. In verschiedenen Analysen wurde gezeigt, dass die nukleäre Akkumulation von p53-Protein mit dem Mutationsstatus korreliert (Marks *et al.*, 1991). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die nukleäre Überexpression des Proteins mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit CRC korreliert (Zeng *et al.*, 1994). Auch Bosari *et al.* (Bosari *et al.*, 1994) konnten eine schlechtere Prognose für CRC mit zytoplasmatischer Akkumulation von p53-Protein nachweisen. Andererseits wurde vermutet, dass sich nicht alle p53-Mutationen mittels immunhistochemischer Färbung nachweisen lassen (Rodrigues *et al.*, 1990). Beim Vergleich von immunhistochemischen Methoden und SSCP-PCR konnte nur eine Korrelation von 68 % erreicht werden (Soong *et al.*, 1996). Insbesondere zeigten sich hier auch p53-mutierte Tumore mit fehlender p53-Überexpression. Der p53-Überexpressionsstatus lässt sonst keine Aussage über genetische Veränderungen des p53-Gens zu. Möglicherweise sind posttranslationale Prozessierungsvorgänge sowie die Expression von Nonsense-Proteinen bei p53-Mutation eine Ursache für die Unzuverlässigkeit der Analyse. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Methoden zur direkten Detektion von Mutationen der DNA-Bindungsdomäne bevorzugt durchgeführt. In einigen Arbeiten, die mit direkter Sequenzierung oder SSCP-PCR durchgeführt wurden, hatten Patienten mit Mutationen in den Exonen 5 bis 8 eine ungünstigere Prognose (Borresen-Dale *et al.*, 1998; Goh *et al.*, 1995; Hamelin *et al.*, 1994; Pricolo *et al.*, 1997). Neuere Analysen konnten diese Korrelation nicht bestätigen. Der p53-Mutationsstatus ist demnach kein unabhängiger Prognosefaktor für verschiedene Tumoren (Elsaleh *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2000; Paradiso *et al.*, 1996; Poller *et al.*, 1997; Soong *et al.*, 2000; Sturm *et al.*, 1999).

Obwohl p53 eine zentrale regulatorische Rolle bei Apoptose- und Zellzyklusregulation einnimmt, ist möglicherweise gerade diese Vielzahl von Funktionen die Ursache dafür, dass sich das Protein nicht als Prognosefaktor eignet. Der basale p53 Wildtyp Spiegel

ist gewebeabhängig und aufgrund eines hohen Proteinumsatzes sowie der Repression durch Mdm-2 gering. Das Protein kann durch eine Vielzahl von Ereignissen stabilisiert und aktiviert werden: durch genotoxische Schäden wie DNA-Strangbrüche, zytotoxischen Stress wie Hypoxie, Hitze, virale Infektion oder Onkogenaktivierung. Über die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen vermittelt p53 seine verschiedenen Funktionen: die Regulation von Wachstum, DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose. Zielgene sind u.a. die Zellzyklusregulatoren p21^{Waf1/Cip1}, Mdm-2, 14-3-3 σ , die Zelltod-aktivatoren Bax, Puma, Noxa, Nbk, IGF-BP3 und p53-AiP1, sowie die DNA-Reparaturfaktoren MSH-2 und GADD45. Zellzyklusarrest wird über Induktion von p21^{Waf1/Cip1} als Antwort auf DNA-Schäden vermittelt. Zusätzliche Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen nach Bestrahlung oder Chemotherapie ermöglichen der Zelle, sich von der Schädigung zu erholen und zu überleben (Funk, 1999). p53-vermittelte Apoptose kann als Folge von DNA-Schäden, Expression von E1A oder c-Myc oder nach Entzug von Wachstumsfaktoren aktiviert sowie durch antiapoptotisches Bcl-2 gehemmt werden. Über Aktivierung von BH 3-only Proteinen wie Puma, Noxa, Nbk, den Multidomänen Bcl-2-Homologen Bax und Bok, dem mitochondrialen DISC und der Caspasenkaskade wird Apoptose ausgelöst.

Da die monogene Analyse des p53-Gens keine Relevanz für die Prognose CRC hat, ist die Analyse der nachgeschalteten Effektoren in Abhängigkeit vom p53-Mutationstatus der DNA-Bindungsdomäne von besonderem Interesse.

4.1.2 Verminderte Bax-Expression korreliert mit schlechter Prognose

In dieser Arbeit konnte eine prognostische Relevanz der Bax-Proteinexpression für CRC im Stadium III nachgewiesen werden. Geringe Bax-Proteinexpression geht mit ungünstiger Prognose einher und ist ein prognostisch unabhängiger Faktor für das fortgeschrittene CRC. Zwischen der Bax-Expression und den klinisch-pathologischen Daten besteht jedoch keine signifikante Korrelation. Ebenso hängt die Infiltrationstiefe des Primärtumors nicht vom Niveau der Bax-Expression ab. Tendenziell ist die Proteinexpression in Tumoren mit höherem Lymphknotenstatus und höherem Grading vermindert.

Das proapoptotische Bax-Gen wird durch p53 transkriptionell reguliert (Miyashita und Reed, 1995). Bax induziert über den mitochondrialen Signaltransduktionsweg die Frei-

setzung von Cytochrom c mit konsekutiver Veränderung der mitochondrialen Permeabilität (Gross *et al.*, 1999; Pastorino *et al.*, 1998). Über die Aktivierung von APAF-1 und Pro-Caspase 9 wird die Endstrecke der Caspasenkaskade induziert, welche letztendlich den Zelltod auslöst. Verlust des Bax-Proteins kann bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet werden. Die Mechanismen für den Proteinverlust sind aber in den meisten Tumoren noch unklar. Bei Hypermethylierung des Bax-Promotors (Carton *et al.*, 2002), Frameshiftmutationen mit Ausbildung eines Stopkodons oder Punktmutationen der BH1- und BH3-Domäne, kann ein Verlust der Bax-Expression beobachtet werden.

Apoptoseregulatoren der Bcl-2-Familie, insbesondere Bax, werden auf Grund ihrer Bedeutung für die therapieinduzierte Apoptose intensiv untersucht. Bax ist nicht nur ein zentraler Effektor der p53-abhängigen onkogenen Transformation (McCurrach *et al.*, 1997), sondern auch der chemotherapeutisch induzierten Apoptose (Wagener *et al.*, 1996). Dabei ist die prognostische Bedeutung der Bax-Expression auch in Abhängigkeit von adjuvanten oder palliativen Therapien für verschiedene Tumorentitäten von zentralem Interesse. Schwache Bax-Expression geht auch bei Non-Hodgkin-Lymphomen mit einer schlechten Prognose einher (Gascoyne *et al.*, 1997). Beim metastasierten Mammakarzinom korreliert schwache Bax-Expression mit kürzerem Überleben (Krajewski *et al.*, 1995). Des Weiteren kann bei diesen Patienten ein schlechteres Ansprechen auf zytotoxische Chemotherapien beobachtet werden. Ähnliches konnte bei der Analyse von Ovarialkarzinomen beobachtet werden. Die Mehrzahl der Bax-exprimierenden Tumore zeigten nach Chemotherapie mit Paclitaxel und einem Platinaanalogon eine komplette Remission sowie ein längeres krankheitsfreies Überleben (Tai *et al.*, 1998). Auch beim Adenokarzinom des Pankreas geht starke Bax-Expression mit einer besseren Prognose einher (Friess *et al.*, 1998).

Für das CRC konnte an einer kleinen, nicht stadienspezifischen Untersuchung längeres Überleben bei Bax-positiven Tumoren beobachtet werden (Ogura *et al.*, 1999). Es konnte keine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern aufgezeigt werden. Andererseits war starke Bax-Expression signifikant mit geringer Lymphgefäßinvasion und geringer Invasionstiefe assoziiert. Hingegen zeigte eine Arbeit von Sturm *et al.* bei hepatisch metastasierten CRC, dass Verlust von Bax mit höherem Differenzierungsgrad und schlechterer Prognose assoziiert ist (Sturm *et al.*, 1999). Die Diskrepanz dieser Daten zu den hier präsentierten, spiegelt das Problem der Vergleichbarkeit von Daten wieder. Unterschiedliche Methoden der Herstellung und Auswertung von immunhistochemischen Färbungen, des Stichprobenumfangs und der Art des Tumormaterials wir

ken dabei erschwerend. Des Weiteren ist die transkriptionelle Regulation der Bax-Expression noch nicht vollständig bekannt. Bax wird p53-abhängig induziert, es kann aber auch über Bak, die BH3-only-Proteine Nbik/Bik, Puma und Noxa Apoptose vermitteln. Welche Bedeutung diese Signalwege für die Bax-Proteinexpression haben, ist noch unklar. Dennoch kann, nicht zuletzt aufgrund der vorliegenden Studie davon ausgegangen werden, dass der Verlust von Bax-Protein ein unabhängiger prognostischer Faktor für das kolorektale Adenokarzinom ist.

4.1.3 Der p53/Bax-Signalweg ist von prognostischer Relevanz

Die Deregulation des p53/Bax-Signalwegs infolge von p53-Mutation und Expressionsverlust von Bax, ist prognostisch besonders ungünstig für den Krankheitsverlauf von CRC im Stadium III. Interessanterweise besteht aber keine Korrelation zwischen dem p53-Status und der Bax-Expression. p53-Wildtyp und p53-mutierte Tumore unterscheiden sich in der Bax-Expression nicht signifikant. Eine Erklärung dieser Diskrepanz ist möglicherweise die Tatsache, dass Bax von 2 Promotoren, einem in der 5'-untranslatierten Region und einem zweiten in Exon 1 und 2, transaktiviert wird (Miyashita *et al.*, 1994). Des Weiteren wird Bax nicht nur durch p53 reguliert. BH3-only Proteine wie Nbik/Bik, tBid, Bim, Bad, Noxa, Puma oder Hrk können Bax transaktivieren. Andererseits kann p53 in einigen Fällen trotz Mutation des Gens durch differenzielle Effekte induziert werden. p53 wird durch verschiedene Signale induziert und stabilisiert. Über die Transaktivierung von Zielgenen wie p21^{Waf1/Cip1}, 14-3-3 σ , Puma, Noxa, Gadd45, MSH2, Apaf-1, u.a. vermittelt es seine verschiedenen Funktionen: die Regulation von Wachstum, Zellzyklus und Apoptose. Wird p53 in Folge von DNA-Schäden, Expression von E1A oder c-Myc oder nach Entzug von Wachstumsfaktoren induziert, vermittelt es Apoptose u.a. über die Transaktivierung von Bax, den mitochondrialen DISC und die Caspasenkaskade.

Die Inaktivierung des p53-Signalwegs sowie verschiedener nachgeschalteter Regulatoren konnte in anderen Tumoren prognostische Signifikanz aufweisen. Eine Vorarbeit zur p53-Signalweganalyse von Lebermetastasen kolorektaler Adenokarzinome konnte ebenfalls ein besseres Überleben der Patienten mit intaktem Signalweg, p53-Wildtyp-Tumoren und starker Bax-Expression, aufzeigen (Sturm *et al.*, 1999). Durch die multigene Analyse des p53/Bax/p16-Signalwegs von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

gus (Sturm *et al.*, 2001) können Patienten mit günstiger Prognose identifiziert werden. In experimentellen Arbeiten zur Bax-Regulation konnte gezeigt werden, dass p53 das Bax-Gen transaktiviert und so die Bax-Expression verstärkt. Für CRC im Stadium III kann *in vivo* jedoch keine Abhängigkeit der Bax-Proteinexpression vom p53-Mutationsstatus festgestellt werden. Der p53-Mutationsstatus scheint nicht der determinierende Faktor für die Expression von Bax zu sein (DeAngelis *et al.*, 1998). Möglicherweise kann Bax auch noch durch einige mutierte p53-Varianten transkriptionell aktiviert werden. Das Bax-Gen kann weiterhin auch über p53-unabhängige Signalwege induziert werden. In p53-mutierten Tumoren könnte so die insuffiziente p53-Funktion umgangen werden und Bax anderweitig induziert werden. Umgekehrt ist es wahrscheinlich, dass eine reduzierte Bax-Expression in p53-kompetenten Tumoren durch die Aktivierung redundanter nachgeschalteter Signalwege von anderen Genen substituiert werden kann, wie z.B. p73 oder p63.

4.1.4 p16^{INK4a} ist kein unabhängiger Prognosefaktor für das CRC

Die p16^{INK4a}-Expression hat keine unabhängige prognostische Bedeutung für fortgeschrittene CRC. Es besteht weiterhin kein Zusammenhang zwischen p16^{INK4a}-Expression und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern bei Tumoren im Stadium III. Eine tendenziell verminderte p16^{INK4a}-Expression ist in pT₄- gegenüber pT₁-Tumoren zu beobachten. Im Gegensatz dazu hat der p53/p16^{INK4a}-Status einen Einfluss auf die Prognose (Wilcoxon-Test p=0,0409; Mantel-Cox Log-Rang-Test p=0,09). p53-Wildtyp und hohe p16^{INK4a}-Expression gehen mit einer besseren Prognose einher. Diese Tumore zeigen zudem eine höhere mediane p16^{INK4a}-Expression als die mutierten Tumore. Es besteht jedoch keine Korrelation von p16^{INK4a}- und Bax-Expression.

Bei der Tumorentstehung und Progression ist die Dysregulation des Zellzyklus von zentraler Bedeutung. Innerhalb dieses Signalwegs hat das p16^{INK4a}-Gen eine regulatorische Funktion. p16^{INK4a} wird von p53 bei zytotoxischem Stress wie DNA-Schäden oder Hypoxie induziert. Es verhindert die Assoziation von CDK4 und CDK6 mit den D-Typ-Cyklinen und führt so über die Regulation der Rb-Aktivität zum G₁-Arrest. Die Inaktivierung des p16^{INK4a}-Gens ist ein häufiges Ereignis in humanen Tumoren und kann als Folge von Deletionen, Frameshift-Mutationen, Promotorhypermethylierung und Punktmutationen entstehen. Die meisten dieser genetischen und epigenetischen Verände

rungen resultieren in einer verminderten oder fehlenden p16^{INK4a}-Expression (Reed *et al.*, 1996; Papdimitrakopoulou *et al.*, 1997). Zellen mit verminderter oder fehlender p16^{INK4a}-Expression sind resistenter gegenüber DNA-Schäden, welche bei Zellen mit intaktem p16^{INK4a} und Rb-Protein zum Wachstumsarrest führen würden (Shapiro *et al.*, 1998). Des Weiteren scheinen p53 und p16^{INK4a} bei der Apoptoseinduktion zu kooperieren (Sandig *et al.*, 1997). p16^{INK4a} kann somit die Funktion eines Tumorsuppressors übernehmen (Sharpless *et al.*, 1999). Bei der Signalweganalyse ist deshalb auch die prognostische Bedeutung der p53/p16^{INK4a}-Dysregulation von Interesse.

Insgesamt war die p16^{INK4a}-Expression der untersuchten Tumore gering. Die Beurteilung von p16^{INK4a}-Verlusten in den immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten wurde dadurch erschwert. Möglicherweise sind Schwankungen des p16^{INK4a}-Gehalts während der verschiedenen Zellzyklusphasen eine Ursache. Andererseits mag ein anderer CDK-Inhibitor wie p21^{Waf1/Cip1}, p27 oder ein anderes Mitglied der INK4-Familie von größerer Bedeutung sein. Grundsätzlich exprimieren Normal- und Primärtumorgewebe wenig p16^{INK4a}-Protein (Ruas und Peters, 1998; Geradts *et al.*, 1995), am wenigsten während der G₀- und frühen G₁-Phase. Zudem ist die Expression von p16^{INK4a} gewebeabhängig. In Kolonkarzinomzellen scheint sie niedrig zu sein (Geradts *et al.*, 1995). Für verschiedene Tumorgewebe werden trotzdem p16^{INK4a}-Expressionsverluste beschrieben (Kratzke *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1995). Obwohl Verlust der p16^{INK4a}-Expression in kolorektalen Karzinomen ein seltenes Ereignis zu sein scheint (Geradts *et al.*, 1995), wiesen die Tumorproben eine hohe Schwankungsbreite zwischen sowohl hoher als auch geringer p16^{INK4a}-Expression auf.

Obwohl bei verschiedenen Tumoren ein prognostischer Einfluss der Proteinexpression auf den Krankheitsverlauf beobachtet werden kann, ist die p16^{INK4a}-Expression für sich genommen kein prognostischer Faktor für dieses CRC Patientenkollektiv. Bekannt ist, dass der Verlust von p16^{INK4a}-Protein bei malignen Melanomen (Reed *et al.*, 1995) mit Tumorprogression korreliert. Verlust von p16^{INK4a}-Protein kann als prognostisch ungünstiger Faktor für NSCLC (Kratzke *et al.*, 1996) und Plattenepithelkarzinome des Ösophagus (Sturm *et al.*, 2001) beschrieben werden. In einer Studie zur Hypermethylierung des p16^{INK4a}-Promotors kolorektaler Karzinome im Stadium III geht p16^{INK4a}-Inaktivierung mit kürzerem Überleben einher (Liang *et al.*, 1999). Da hier jedoch nur eine tendenziell schlechtere Prognose für Patienten mit schwacher p16^{INK4a}-Expression beobachtet werden kann, ist möglicherweise die Wahl von Methode und Stichprobe von entscheidender Bedeutung. Alternativ hierzu könnte bei der Studie von Liang *et al.* die

Methylierung weiterer therapeutisch relevanter Gene Grund für die prognostische Relevanz dieser monogenetischen Studie sein.

Andererseits ist der p53/p16^{INK4a}-Status möglicherweise von prognostischer Bedeutung. p53-Wildtyp und hohe p16^{INK4a}-Expression gehen mit einer besseren Prognose einher. Diese Tumore zeigen zudem eine höhere mediane p16^{INK4a}-Expression als die mutierten Tumore. Bei der Analyse der prognostischen Relevanz des p16^{INK4a}/p53/p14^{ARF}-Signalwegs für aggressive Non-Hodgkin-Lymphome konnte die Dysregulation dieses Signalwegs als unabhängiger prognostischer Faktor definiert werden (Gronbaek *et al.*, 2000). Das gleichzeitige Vorliegen von p16^{INK4a} und p53/p14^{ARF}-Mutationen geht dort mit einer signifikant schlechteren Prognose einher.

Obwohl p53 und p16^{INK4a} bei der Apoptoseinduktion über Bax und den mitochondrialen DISC zu kooperieren scheinen (Sandig *et al.*, 1997), besteht keine Korrelation von p16^{INK4a}- und Bax-Expression für CRC im Stadium III. Bei der Signalweganalyse von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus hatten die Patienten mit intaktem Bax/p16^{INK4a}-Signalweg die beste Prognose (Sturm *et al.*, 2001). In einer zusätzlichen multigenen Signalweganalyse wurden Cyclin D, Bax und p16^{INK4a} als unabhängige Prognosefaktoren für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus definiert (Güner *et al.*, 2002). Im gegenwärtigen Kollektiv kolorektaler Karzinome hatten die Patienten mit niedriger Bax- und p16^{INK4a}-Proteinexpression die tendenziell schlechteste Prognose, schlechter als für niedrige Bax-Expression allein. Da das Ergebnis lediglich grenzwertig signifikant ist, kann dieser Zusammenhang letztlich jedoch nur vermutet werden. Ob die beiden Parameter innerhalb eines Signalwegs kooperieren oder unabhängig voneinander Apoptose induzieren und inwieweit Zellzyklusarrestkontrolle durch p16^{INK4a} hier eine Rolle spielt ist noch unklar.

4.1.5 p53-Status, Bax- und p16^{INK4a}-Expression sind keine Prognosefaktoren im Stadium IV

Im Stadium IV konnte keine prognostische Relevanz des p53-Status oder der Bax- und p16^{INK4a}-Expression nachgewiesen werden. Bei der Korrelation von p16^{INK4a}-Expression und den untersuchten klinisch-pathologischen Parametern konnte lediglich eine tendenzielle Zunahme der Proteinexpression in Tumoren mit fortgeschrittenem Lymphknotenstatus von pN₀ zu pN₄ sowie auch bei Entdifferenzierung von G₂ zu G₃ beobachtet wer

den.

Im Gegensatz zu einer vorangegangenen Arbeit zum Gesamtüberleben nach Lebermetastasenresektion bei CRC, hat die Bax-Expression im Stadium IV keinen Einfluss auf die Prognose (Sturm *et al.*, 1999). Anders als bei den untersuchten Lebermetastasen stellen die hier untersuchten Tumore im Stadium IV eine heterogene Gruppe dar, die sich beträchtlich hinsichtlich der Lokalisation, Anzahl und Ausprägung der Fernmetastasen unterscheidet. Somit sind die Daten nur schwer vergleichbar. Wahrscheinlich überwiegen hier die Vielzahl und Heterogenität individueller maligner Ereignisse und minimieren so den proapoptotischen Effekt von Bax.

Ob die verstärkte p16^{INK4a}-Expression in fortgeschrittenen Tumoren einen realen Trend darstellt oder ein statistisches Artefakt ist, bleibt unklar. Auch hierzu kann aufgrund der Heterogenität der Tumore keine zuverlässige Aussage getroffen werden. Für weitere Analysen der Tumore im Stadium IV sollten deshalb Lokalisation, Anzahl und Ausprägung der Fernmetastasen berücksichtigt werden.

4.1.6 Repräsentativität der Stichprobe

In dieser Analyse wurden neben den „konventionellen“ bzw. etablierten prognostischen Faktoren der TNM-Klassifikation auch molekulare Regulatoren mit potentieller prognostischer klinisch-pathologischer Relevanz für das CRC untersucht. Einer dieser konventionellen Faktoren ist die Tumorlokalisation. Es ist bekannt, dass die Prognose rektaler Adenokarzinome ungünstiger ist als die von Kolonkarzinomen. Auch in dieser Kohorte ist die Prognose für rektale Karzinome schlechter als für Kolonkarzinome. In der univariaten Analyse ist die Tumorlokalisation im Rektum mit dem höchsten relativen Risiko verbunden, an der Erkrankung frühzeitig zu versterben. Dies gilt auch für die multivariate Analyse, in der das relative Risiko an einem rektalen Karzinom früh zu versterben, um den Faktor 5,4 erhöht ist. Weitere mögliche Risikofaktoren wie hohes Lebensalter und männliches Geschlecht sind nicht mit einem erhöhten relativen Risiko verbunden. Der Lymphknotenstatus ist als einziger Parameter der TNM-Klassifikation mit einem erhöhten Sterberisiko verbunden, nicht jedoch die Infiltrationstiefe des Primärtumors oder der Differenzierungsgrad.

Ein Grund dafür ist möglicherweise die geringe Fallzahl der Studie. Die insgesamt 116 Patienten wurden aufgrund der statistisch unterschiedlichen Überlebensraten auf die

Stadien III und IV aufgeteilt werden. Der Stichprobenumfang der einzelnen Gruppen wurde so auf 59 im Stadium III und 57 im Stadium IV reduziert. Durch Verkleinerung des Stichprobenumfangs verändert sich die Power eines statistischen Tests. Die statistische Power gibt die Wahrscheinlichkeit an, eine wahre Differenz der Überlebenskurven zu erkennen (Glantz, 1998). Sie ist von verschiedenen Faktoren abhängig: der Größe des zu erkennenden Unterschieds, vom Fehler erster Art, dem Risiko für ein falsch positives Ergebnis, und von der Größe der Stichprobe (Glantz, 1998). Andererseits ist der zum Erkennen des Unterschieds benötigte Stichprobenumfang von der Power und dem Fehler erster Art abhängig. Wird die Power durch Verkleinerung der Fallzahl geringer, steigt zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler zweiter Art, ein falsch negatives Ergebnis, an. Dabei wird ein existenter Unterschied nicht erkannt. Deshalb sollte die Signifikanz der in dieser Analyse als nicht signifikant bewerteten Parameter an größeren Patientenkollektiven überprüft werden; insbesondere die Relevanz des p16^{INK4a}-, p53/Bax-, p53/p16^{INK4a}- und Bax/p16^{INK4a}-Status für die Prognose der Patienten mit CRC im Stadium III und IV.

4.2 Relevanz der Apoptose- und Zellzyklusregulation für die Therapie maligner Tumore

4.2.1 TNM-Klassifikation

Die stadienadaptierte Behandlung CRC orientiert sich an der TNM-Klassifikation der UICC. Diese Klassifikation bietet Ärzten eine Methode zur Therapieplanung, Prognoseabschätzung und Bewertung des Krankheitsverlaufs. Bis heute basiert die Klassifikation ausschließlich auf der anatomischen Tumorausbreitung, die als Infiltrationstiefe, Lymphknoteninfiltration und Fernmetastasen in die Stadieneinteilung eingehen. Die Stadieneinteilung der TNM-Klassifikation wird den Therapiezielen und auch der Prognoseabschätzung als Grundlage für die spezifische Behandlung CRC allerdings nicht immer gerecht. So konnten Greene *et al.* signifikante Unterschiede der 5-Jahresüberlebensrate von 5988 Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium III beschreiben (Greene *et al.*, 2003). Die subgruppenspezifische Untergliederung des Stadium III in ein Stadium IIIa (T_{1/2}, N₁), b (T_{3/4}, N₁) und c (jedes T, N₂) wies signifikant unterschiedliche 5-Jahresüberlebensraten unabhängig von den adjuvanten Therapien auf.

Ein Anliegen dieser Arbeit war es deshalb, die prognostische Relevanz von Apoptose- und Zellzyklusregulatoren für Patienten mit fortgeschrittenem CRC hinsichtlich der Identifikation von Subgruppen mit unterschiedlicher Prognose zu überprüfen. Die Patienten wurden nach Stadien getrennt untersucht, da sich die Prognose aufgrund der Fernmetastasierung im Stadium IV deutlich verschlechterte. Für das CRC im Stadium III können die zytoplasmatische Bax-Proteinexpression sowie die Deregulation des p53/Bax-Signalwegs als prognostische Faktoren angenommen werden. Patienten mit niedriger Bax-Expression sowie p53-Mutation und niedriger Bax-Expression haben eine signifikant ungünstigere Prognose. Da die Fallzahl dieser Analyse niedrig ist, sollte das Ergebnis an größeren Patientengruppen validiert werden. Dann wäre eine Orientierung an diesem Parameter für spezifischere Therapien und Prognoseabschätzung möglich. Des Weiteren müsste insbesondere die mögliche Unterteilung des TNM-Stadium III in ein Stadium IIIa, mit p53-Wildtyp und starker Bax-Expression sowie IIIb, mit p53-Mutation und niedriger Bax-Expression überprüft werden.

4.2.2 Apoptosesignaldefekte und Therapieresistenz

Die Therapie kolorektaler Karzinome mit kurativer Zielsetzung basiert auf zwei Säulen, den primär chirurgischen Maßnahmen und den nicht chirurgischen Therapien. Auf die Bedeutung der Apoptose- und Zellzyklusregulatoren für nicht chirurgische Therapien soll hier näher eingegangen werden.

Nahezu alle adjuvanten und neoadjuvanten Therapien basieren auf dem Prinzip, Zellzyklusarrest und Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Zytotoxische Therapien induzieren auf den verschiedenen Ebenen der Apoptosesignalkaskade Zelltod. Therapeutisch relevant ist der mitochondriale DISC (Wieder *et al.*, 2001). Infolge der Inaktivierung dieses Signalwegs können Tumorzellen Anti-Tumor-Therapien überleben und resistent werden. Neben verschiedenen metabolischen Entgiftungsmechanismen der Resistenzentwicklung kann Resistenz von Zellen gegenüber Apoptosesignalwegen Chemotherapieresistenz bedingen (Wu und El-Deiry, 1996). Dies ist in allen erwähnten Signalwegen der Zelltodregulation als Folge von Funktionsverlust apoptosefördernder Gene oder der Überaktivität apoptosehemmender Signale möglich (Daniel, 2003a). Diese Ergebnisse wurden bisher vorwiegend *in vitro* nachgewiesen. Eine Zuordnung von spezifischen Defekten zu einer bestimmten Tumorart, welche eine zukünftige indi

viduelle Anpassung von Therapiekonzepten erlauben könnte, ist noch nicht möglich. Hier liefert die vorliegende Studie einen wichtigen Baustein.

Auch Schäden von zellulären Reparaturmechanismen sind für Therapieresistenz verantwortlich. Bei Inaktivierung des ATM (Ataxia-teleangiectasia mutated)-Gens ist die Sensitivität der Tumorzelle gegenüber DNA-Schädigung reduziert. Die ATM-Kinase wird bei strahleninduzierter DNA-Schädigung aktiviert und induziert über die Phosphorylierung von Substraten (p53, c-Abl, Rad519) die Aktivierung von Zellzyklusarrest und Escapemechanismen. Dies kann zur Ausbildung von resistenten Phänotypen führen. Die Relevanz von verschiedenen Defekten der Apoptoseinduktion für die Entstehung von Therapieresistenzen wird derzeit intensiv untersucht.

Die Inaktivierung des p53-Signalwegs sowie der nachgeschalteten Regulatoren, insbesondere der DNA-Reparaturmechanismen, der Zellzyklus-Checkpunkte und der Apoptosesignalkaskade sind dabei von zentralem Interesse. Therapieresistenz bedingt durch Mutationen des p53-Gens kann bei B-CLL-Zellen *in vitro* beobachtet werden (Sturm *et al.*, 2003). Diese Mutationen gehen außerdem mit schlechterer Prognose einher und sind *in vitro* mit Apoptoseresistenz gegenüber Alkylantien, Fludarabin und ionisierender Strahlung korreliert (Sturm *et al.*, 2003). p53-Mutationen treten dabei häufiger bei Patienten auf, die mit Alkylantien vortherapiert worden sind. In experimentellen Modellen kann durch Alkylantien p53-Inaktivierung als Folge von Mutationen ausgelöst werden. Therapieresistenz kann möglicherweise durch p53-Inaktivierung in Folge von DNA-schädigender Therapie entstehen.

Auch das Bax-Protein ist bei der Entstehung von Chemotherapieresistenzen von Bedeutung. Die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika kann durch Bax-Überexpression in Mammakarzinomzellen verstärkt werden (Wagener *et al.*, 1996). Reduzierte Bax-Expression geht mit einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Anthrazyklinen (Doxorubicin, Epirubicin), Alkylantien (Chlorambucil, Mafosfamid) und Vincristin bei Patienten mit B-CLL einher (Bosanquet *et al.*, 2002). Zum CRC gibt es nur wenige Daten. *In vitro* scheint die Therapieresistenz gegenüber 5-Fluoruracil (5-FU 5-Fluoruracil) vom p53/Bax-Signalweg abhängig zu sein. Bei der Analyse 5-FU-induzierter Apoptose in kolorektalen Zelllinien konnte eine Abhängigkeit der Resistenz vom p53/Bax-Status beobachtet werden (Violette *et al.*, 2002). Die Langzeitbehandlung von p53-Wildtypzellen mit 5-FU ging bei gleichzeitig verminderter Bax-Proteinexpression mit Apoptoseresistenz der Zellen einher. Außerdem resultierte in p53-Wildtyp und p53-

mutierten Zelllinien hohe Bcl-2- und Bcl-xL-Proteinexpression sowie niedrige Bax-Expression in verstärkter Chemoresistenz gegenüber 5-FU. *In vivo* Daten zum Rektumkarzinom zeigten hingegen, dass der p53/Bax-Status bei einer kombinierten Behandlung mit Bestrahlung sowie 5-FU mit und ohne Hyperthermie für das Ansprechen keine Rolle spielt. Vermutlich können Defekte im p53/Bax-Signalweg durch die Kombinationstherapie umgangen werden (Rau *et al.*, 2003). Möglicherweise sind aber auch Zellzyklusregulatoren wie p21^{Waf1/Cip1} an der Resistenzentwicklung von Rektumkarzinomen beteiligt. Nach zytotoxischer Therapie und Bestrahlung hatten die Patienten mit posttherapeutisch reduzierter p21^{Waf1/Cip1}-Expression eine bessere Prognose als Patienten mit posttherapeutisch angestiegener p21^{Waf1/Cip1}-Expression (Rau *et al.*, 2003). Auch bei der Deregulation des p53/p16^{INK4a}/p14^{ARF}-Signalwegs scheinen CDK-Inhibitoren für die Resistenzentwicklung von Bedeutung zu sein. Im Mausmodell konnte die Ausbildung von aggressiven Lymphomentitäten durch Inaktivierung des INK4a Genlokus beobachtet werden (Schmitt *et al.*, 1999).

Obwohl das Verständnis der spezifischen Resistenzmechanismen maligner Tumore noch lange nicht ausreichend ist, wird dennoch nach Möglichkeiten gesucht, die bislang bekannten Mechanismen zu revertieren und gezielt zu umgehen. Die molekularen Grundlagen bieten dabei diverse Ansatzmöglichkeiten.

Der p53-vermittelte Signalweg zur Aktivierung des mitochondrialen DISC, des Apoptosoms, kann auf verschiedenen Ebenen aktiviert werden. Durch den Einsatz von niedermolekularen Substanzen kann beispielsweise mutiertes und dadurch missgefaltetes p53-Protein in eine funktionelle Form zurückgefaltet werden (Foster *et al.*, 1999). Das antiapoptotische Bcl-2 kann durch Antisense-Oligonukleotide inaktiviert werden (Klasa *et al.*, 2001). Auch das mitochondriale Apoptosom kann über den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor und dessen Inhibitoren in seiner Aktivität moduliert werden (Maaser *et al.*, 2001). Signaldefekte in Tumoren können auf den verschiedenen Ebenen spezifisch modifiziert und so normale Zellen vor zytotoxischen Nebenwirkungen geschützt werden. Flavopiridol, ein Kinaseinhibitor, kann CDK hemmen und so, wie auch der bei CML erfolgreich eingesetzte Tyrosinkinaseinhibitor STI-571 (Imatinib), Zellzyklusarrest und Apoptose auslösen (Senderowicz *et al.*, 2000).

Gentherapeutische Ansätze, die über die Einschleusung von Apoptose fördernden sowie Zellzyklus hemmenden Genen in die Zelle verabfolgt werden, sind jedoch noch weit von der klinischen Anwendung entfernt. Mit Hilfe von viralen Gentherapievektoren kön

nen die proapoptotischen Bcl-2-Homologe Bax, Bak, Nbk/Bik (Radetzki *et al.*, 2002) und Pro-Caspase 3 (Friedrich *et al.*, 2001) in Zellen eingeschleust werden und Apoptose induzieren bzw. Therapieresistenz revertieren. Zellzyklushemmende Gene wie p16^{INK4a}, p53 oder p14^{ARF} (Hemmati *et al.*, 2002) können ebenfalls über virale Vektoren in Tumorzellen eingeschleust werden und deren Wachstum hemmen. Diese Ansätze werden aber derzeit, mit Ausnahme von p53, nicht in klinischen Studien getestet. Der Grund dafür sind ungelöste Probleme zum viralen Gentransfer *in vivo*.

Letztendlich gilt aber auch für diese neuen, selektiven molekularen Therapiestrategien von malignen Tumoren, dass die genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen bei der Tumorentstehung und Progression von zentraler Bedeutung ist, um optimale Anwendung und Wirksamkeit in Abhängigkeit von therapeutischen Zielstrukturen und Signalkaskaden zu gewährleisten. Besonderer Wert sollte hierbei auf die Analyse möglichst kompletter Signalkaskaden gelegt werden, um auch komplexe Störungen und Inaktivierung von Signalwegen und Resistenzmechanismen auf multiplen Ebenen zu erfassen.

4.3 Schlussfolgerung

Die Analyse von Schlüsselgenen der Apoptose- und der Zellzyklusregulation zeigte in dieser Studie prognostische Bedeutung für Patienten mit CRC im Stadium III. Insbesondere geringe Bax-Expression ist ein unabhängiger prognostisch ungünstiger Faktor für Patienten mit CRC im Stadium III. Durch kombinierte Analyse von p53 und Bax konnte die prognostische Aussagekraft weiter verbessert werden. Ebenso hatten Patienten mit intakter p16^{INK4a}-Expression und Wildtyp p53 eine bessere Prognose. Hingegen hatte die monogenetische Analyse von p16^{INK4a} bzw. p53 keine prognostische Relevanz. Bei der Untersuchung etablierter klinisch-pathologischer Parameter waren der Lymphknotenstatus (pN_{2,3}) und die Tumorlokalisation im Rektum von unabhängiger prognostischer Relevanz. Diese Studie unterstützt das Konzept der multigenen oder „Multimarker“-Analyse von Genen der Apoptose- und Zellzyklusregulation, welche aufeinanderfolgend bzw. synergistisch wirken und dadurch von Vorteil gegenüber monogenen Analysen sind. Diese „neuen“ molekularen Marker könnten nach weiterer Untersuchung und Validierung in prospektiven Studien etablierte klinisch-pathologische Prognosefaktoren ergänzen und so zur Therapieoptimierung beitragen.

Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., Cory S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-26.
- Adams, P. D., Kaelin W. G. Jr. (1996). The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol* 208, 79-93
- Altman, D. G., Lausen, B., Sauerbrei, W. et al. (1994). Dangers of using "optimal" cut-points in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 86, 829-35.
- Andre, T., Boni, C., Mounedji-Boudiaf, L. et al. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350, 23, 2343-51.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. 3. erweiterte, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 28-32.
- Arbeitsgemeinschaft CAO/AIO/ARO der Deutschen Krebsgesellschaft (1999). Aktualisierter Konsensus der CAO/AIO/ARO zur adjuvanten Therapie bei Kolon- und Rektumkarzinom. *Onkologie*, 22, 154-56.
- Bargou R. C., Wagener C., Bommert K. et al. (1996). Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest* 97, 2651-59.
- Boland, D., Thibodeau, S., Hamilton, S. et al. (1998). A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5248-57.
- Borresen-Dale, A. L., Lothe, R. A., Meling, G. I. et al. (1998). TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: Mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res* 4, 203-210.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-89.
- Bosanquet A. G., Sturm I., Wieder T. et al. (2002). Bax expression correlates with cel

- lular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamid and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 16, 1035-44.
- Bosari, S., Viale, G. (1995). The clinical significance of p53 aberrations in human tumors. *Virchows Arch* 427, 229-41.
- Bosari, S., Viale, G., Bossi, P. (1994). Cytoplasmic accumulation of p53 Protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 86, 681-87.
- Carton, P. F., Oliver, L., Martin, S. et al. (2002). The expression of a new variant of pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet* 11, 6, 675-87.
- Chang C., Simms D. T., Martin M. A. et al. (1979). Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol* 31, 463-71.
- Cohen, A. M., Minsky, M. B., Schilsky, R. L. (1997). Cancer of the Colon. In: *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. DeVita, V. T. Jr., Hellmann, S, Rosenberg, S. A. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1144-1186.
- Condie, A. (1993). Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of SSCP, constant denaturing gel electrophoresis and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. *Hum Mutat* 2, 58-66.
- Cory, S., Vaux, D. L., Strasser, A. et al. (1999). Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 59, 1685-92.
- Crompton, M. (2000). Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12, 414-19.
- Daniel, P. T. (2000). Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14, 2035-44.
- Daniel, P. T. (2003a). Zellzyklus und Apoptose. In: *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Ganten, Ruckpaul. Heidelberg: Springer-Verlag, 130-174.
- Daniel, P. T., Kroidl, A., Kopp, J., et al. (1998). Immunotherapy of B-cell lymphoma with

- CD3x19 bispecific antibodies: costimulation via CD28 prevents "veto" apoptosis of antibody-targeted cytotoxic T cells. *Blood* 92, 4750-7.
- Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., Belka, C. et al. (2003b). Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem*, 39, 73-88.
- Daniel, P. T., Wieder, T., Sturm, I. et al. (2001). The kiss of death: Promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15, 1022-32.
- DeAngelis, P. M., Stokke, T., Thorstensen, L. et al (1998). Apoptosis and expression of Bax, Bcl-x, and Bcl-2 apoptotic regulatory proteins in colorectal carcinomas, and associations with p53 genotype/phenotype. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 51, 254-61.
- Elsaleh, H., Powell, B., Soontrapornchai, P. et al. (2000). p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 338 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology* 58, 52-9.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. et al. (2000): Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-35.
- Evan, G. I., Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 441, 342-48.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S. et al. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-28.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-67.
- Fizzotti, M., Cimino, G., Pisegna, S. et al. (1995). Detection of homozygous deletions of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16) gene in acute lymphoblastic leukemia and association with adverse prognostic features. *Blood* 85, 2685-90.
- Foster, B. A., Coffey, H. A., Morin, M. J. et al. (1999). Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286, 2507-10.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S. et al. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1, 515-25.
- Friedrich K., Wieder T., Haefen C von et al. (2001). Overexpression of caspase-3 re

- stores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 20, 2749-60.
- Friess, H., Lu, Z., Graber, H. U. et al. (1998). Bax, but not bcl-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut* 43, 414-421.
- Funk, F. O. (1999). Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 19, 4772-80.
- Gascoyne, R. D., Krajewska, M., Krajewsky, S. et al. (1997). Prognostic significance of BAX protein expression in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 3173-3178.
- Geradts, J., Kratzke, R. A., Niehans, G. A. et al. (1995). Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res* 55, 6006-11.
- Gillet, C. E., Barnes, D. M. (1998). Demystified... *Mol Pathol* 51, 310-16.
- Gillissen, B., Essmann, F., Graupner, V. et al. (2003). Induction of cell death by the BH3-only Bcl-2 homolog Nbk/Bik is mediated by an entirely Bax-dependent mitochondrial pathway. *EMBO J* 22, 14, 3580-90.
- Glantz S. A. (1998). Wie man Überlebenszeiten analysiert. In: *Biotstatistik: Ein Fach für die Praxis*. Hrsg. der dt. Ausg.: Achim Heinecke, Wolfgang Köpcke. McGraw-Hill: Frankfurt/M 150-75.
- Goh, H. S., Yao, J., Smith, D. R. (1995). p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 55, 5217-21.
- Goldstein, A. M., Fraser, M. C., Struwing, J. P. (1995). Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4a mutations. *N Engl J Med* 333, 970-74.
- Grabowski, P., Mann, B., Mansmann, U. et al. (2000). Expression of SIALYL-Le(x) antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients. *Int J Cancer* 88, 281-6.
- Grabowski, P., Schindler, I., Anagnostopoulos, I. et al. (2001). Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *Eur Jour Gastroent Hepatol* 13, 405-11.

- Grana, X., Garriga, J., Mayol, X. (1998). Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107, and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17, 3365-83.
- Greene, F. L. (2003). A new TNM-staging strategy for node-positive (stage III) rectal cancer: An analysis of 5.988 patients. ASCO Annunal Meeting. Gastrointestinal Cancer. Colorectal Cancer Malignancies. www.asco.org.
- Gronbaek, K., Nully Brown, P de, Moller, M. B. et al. (2000). Concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 14, 1727-35.
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-911.
- Güner, D., Sturm, I., Hemmati, P. G. et al. (2003). Multigene analysis of Rb-pathway and apoptosis-control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer* 103, 445-54.
- Hamelin, R., Laurent, P. P., Olschwang, S. et al. (1994). Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 106, 42-8.
- Hasegawa, H., Ueda, M., Furukawa, K. et al. (1995). p53 gene mutations in early colorectal carcinoma. De novo vs. adenoma-carcinoma sequence. *Int J Cancer* 64, 47-51.
- Hayashi, K., Yandell, D. W. (1998). How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2, 338-46.
- Hemmati, P. G., Gillissen, B., von Haefen, C. et al. (2002). Adenovirus-mediated overexpression of p14ARF induces p53 and bax-independent apoptosis. *Oncogene* 21, 3149-61.
- Hermanek, P. (1997). Prognostische Faktoren beim kolorektalen Karzinom. *Zentralbl Chir* 122, 20-25.
- Hermanek, P., Mansmann, U., Staimmer, D. S. et al. (2000). The German experience. the surgeon as a prognostic factor in colon and rectal cancer surgery. *Surg Oncol Clin N Am* 9, 33-49.
- Hermanek, P., Wiebelt, H., Staimmer, D. (1995). Expierience of the German multicenter study group SGCRC. *Tumori Suppl* 81, 60-4.
- Hermann, S., Sturm, I., Mrozek, A. et al. (2001). BAX expression in benign and malig

- nant thyroid tumors: Dysregulation of wild type p53 is associated with a high BAX and p21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 92, 8, 805-11.
- Heyman, M., Rasool, O., Borgonovo Brandter, L. et al. (1996). Prognostic importance of p15INK4B and p16INK4 gene inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 14, 1512-20.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S. et al. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551-5.
- Houlston, R. S., Collins, A., Slack, J et al. (1992). Dominant genes for colorectal cancer are not rare. *Ann Hum Genet* 56, 99-103.
- Hsu, Y. T., Youle, R. J. (1998). Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 273, 10777-83.
- Hu, Y. X., Watanabe, H., Ohtsubo, K. et al. (1997). Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 3, 1473-77.
- Huang, C. I., Taki, T., Higashiyama, M. et al. (2000). p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 82, 374-80.
- Hussussian, C. J., Struewing, J. P., Goldstein, A. M. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8, 15-21.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S. et al. (1997). Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16, 1686-94.
- Johnson, D. G., Walker, C. L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 295-312.
- Jürgensmeier, J. M., Xie, Z. H., Deveraux, Q. et al. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA* 95, 4997-5002.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G. et al. (2001). DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of APAF-1. *Oncogene* 20, 3449-

55.

- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Vogelstein, B. et al. (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 253, 661-665.
- Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-70.
- Klasa, R. F., List, A. F., Cheson, B. D. (2001). Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 443-62.
- Krajewski, S., Blomqvist, C., Franssila, K. et al. (1995). Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 55, 4471-8.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.
- Kratzke, R. A., Greatens, T. M., Rubins, J. B. et al. (1996). Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res* 56, 3415-20.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. et al. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by simian virus 40 serum. *J virol* 31, 472-83.
- Kroemer, G. J., Reed, C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 523-19.
- Laken, S. J., Petersen, G. M., Gruber, S. B. et al. (1997). Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nature Genet* 17, 79-83.
- Lane, D. P., Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M. et al. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of lipid attraction signal. *Cell* 113, 717-30.
- Li, A. J., Blow, J. (2001). The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 3, E182-84.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I. et al. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent

- formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Liang, J., Chang, K., Chen, J. et al. (1999). Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3 N0 M0 stage colorectal cancer: association with DNA replication error and shorter survival. *Oncology* 57, 149-56.
- Linzer, D. I. H., Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54 KDa cellular tumor antigen present in SV40-transformed cells and in infected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1, 43-52.
- Lorenz, M., Mueller, H. H., Mattes, E. et al. (2001). Phase II study of weekly 24-hour intra-arterial high-dose infusion of 5-fluorouracil and folinic acid for liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol* 12, 3, 321-5.
- Lorenz, M., Staib-Sebler, E., Gog, C. et al. (2003). Prospective pilot study of neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin in resectable liver metastases of colorectal cancer. Analysis of 42 neoadjuvant chemotherapies. *Zentralbl Chir* 128, 2, 87-94.
- Lowry, D. R., Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Ann Rev Biochem* 62, 851-91.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H. et al. (1998). Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-90.
- Maaser, K., Hopfner, M., Jansen, A. et al. (2001). Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 85, 1771-80.
- Marks, J. R., Davidoff, A. M., Kerns, B. J. et al. (1991). Overexpression and mutations in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 51, 2979-84.
- Martinou, J. C., Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 63-67.
- Müller-Tidow, C., Metzelder, S. K., Buerger, H. (2004). Expression of the p14(ARF) tumor suppressor predicts survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Epub ahead of print.

- McCurrach, M. E., Connor, T. M., Knudson, C. M. (1997). Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2345-9.
- Meijerink, J. P., Mensink, E. J., Wang, K. et al. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 91, 8, 2991-7.
- Merkel, S., Mansmann, U., Papadopoulos, T. et al. (2001). The prognostic inhomogeneity of colorectal carcinomas stage III. a proposal for subdivision of stage III. *Cancer* 92, 11, 2754-59.
- Miller, B. A., Gloeckler, L. A., Hankaiy, W. F. et al. (1992). Cancer statistics review 1973-89. US Department of Health and Human Services, Bethesda.
- Miyashita, T., Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-9.
- Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y. (1998). Activation of the β -Catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 58, 2524-27.
- Moertel, C. G., Fleming, T. R., Macdonald, J. S. et al. (1995). Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med* 122, 5, 321-6.
- Morin, P. J. (1999). β -Catenin signalling in cancer. *BioEssays* 21, 1021-30.
- Morin, P. J., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1996). Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7950-54.
- Nakano, K., Wousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-94.
- Newton, C. R., Graham, A. (1994). PCR. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 156-58.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H. et al. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-58.
- Ogura, E., Senzaki, H., Yamamoto, D. et al. (1999). Prognostic significance of Bcl-2, Bcl-x_L, Bax and Bak expressions in colorectal carcinomas. *Oncol Reports* 6, 365-69.

- Oltvai, Z. N., Millman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-19.
- Orita, M. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the PCR. *Genomics* 5, 874-79.
- Ozawa, M., Baribault, H., Kemler, R. (1989). The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8, 1711-17.
- Papadimitrakopoulou, V., Izzo, J., Lippman, S. M. et al. (1997). Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 14, 1799-803.
- Paradiso, A., Rabinovich, M., Vallejo, C. et al. (1996). p53 and PCNA expression in advanced colorectal cancer: response to chemotherapy and long-term prognosis. *Int J Cancer* 69, 437-41.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M. et al. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 273, 7770-7775.
- Poller, D. N., Baxter, K. J., and Shepherd, N. A. (1997). p53 and Rb1 protein expression: are they prognostically useful in colorectal cancer? *Br J Cancer* 75, 87-93.
- Pricolo, V. E., Finkelstein, S. D., Hansen, K. et al. (1997). Mutated p53 gene is an independent adverse predictor of survival in colon carcinoma. *Arch Surg* 132, 371-4.
- Prokop, A., Wieder, T., Sturm, I. et al. (2000). Relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with a decrease of the bax/bcl-2 ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 14, 1606-13.
- Radetzki, S., Kohne, C. H., von Haefen, C. et al. (2002). The apoptosis promoting bcl-2 homologs nbk/bik overcome drug resistance in mdr-1-negative and mdr-1-overexpressing breast cancer cell lines. *Oncogene* 20, 227-38.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y. et al. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275, 967-9.
- Rao, R. V., Hermel, E., Castro-Obregon, S. et al. (2001). Coupling endoplasmic reticu

- lum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276, 33869-74.
- Rau, B., Sturm, I., Lage, H. et al. (2003). Dynamic Expression Profile of 21WAF/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radio-chemotherapy. *J Clin Oncol* 21, 3391-3401.
- Reed, J. A., Loganzo, F., Jr., Shea, C. R. et al. (1995). Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 55, 2713-8.
- Reed, J. C., Miyashita, T., Takayama, S. et al. (1996). Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 60, 23-32.
- Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F. (1996). A mutated β -catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183, 1185-92.
- Rodrigues, N. R., Rowan, A., Smith, M. E. et al. (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 7555-59.
- Roussel, M. F. (1999). The INK4a family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311-17.
- Rozenfeld-Granot, G., Toren, A., Amariglio, N. et al. (2001). Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol* 29, 399-402.
- Ruas, M., Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-77.
- Rudner, J., Jendrossek, V., Belka, C. (2002). New insights in the role of Bcl-2 Bcl-2 and the endoplasmatic reticulum. *Apoptosis*, 7, 5, 441-7.
- Sandig, V., Brand, K., Herwig, S. et al. (1997). Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med* 3, 313-9.
- Schmitt, C, A., McCurrach, M. E., Stanchina, E. de et al. (1999). INK4a/ARF mutations

- accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 13, 2670-2677.
- Schmoll, H. J. (1997). Kolorektales Karzinom. In: Kompendium Internistische Onkologie. Schmoll, H. J., Höffken, K., Possinger, K. Heidelberg: Springer Verlag, 694-759.
- Senderowicz, A. M. (2000). Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6600-6606.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E. et al. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shapiro, G. I., Edwards, C. D., Ewen, M. E. et al. (1998). p16INK4A participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 18, 378-87.
- Sharpless, N. E., DePinho, R. A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9, 22-30.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. et al. (2000). Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 275, 12321-25.
- Simms, L. A., Radford-Smith, G., Biden, K. G. et al. (1998). Reciprocal Relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancer. *Oncogene*, 17, 15, 2003-8.
- Soengas, M. S., Capodieci, P., Polsky, D. et al. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-11.
- Soong, R., Powell, B., Elsaleh, H. et al. (2000). Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumor site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer* 36, 2055-60.
- Soong, R., Robbins, P. D., Dix, B. R. et al. (1996). Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 27, 1050-5.
- Sturm, I., Bosanquet, A., Head, D. (2003). P53 mutation in B-CLL: Impact on drug sensitivity profiles and disease prognosis. *Cell Death Diff* 10, 477-84.
- Sturm, I., Kohne, C. H., Wolff, G. et al. (1999). Analysis of the p53/BAX pathway in colo

- rectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* 17, 1364-74.
- Sturm, I., Papadopoulos, S., Hillebrand, T. et al. (2000). Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer* 87, 517-21.
- Sturm, I., Petrowsky, H., Volz, R. et al. (2001). Analysis of p53/BAX/p16ink4a/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: High BAX and p16ink4a/CDKN2 identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol*, 19, 8, 2272-81.
- Sugarbaker, J. P., Gunderson, L. L., Wittes, R. E. (1985). Colorectal cancer. *Cancer: Principles and practices of oncology*. DeVita, V. T., Hellmann, S., Rosenberg, S. A. Philadelphia: J. B. Lippincott 800-3.
- Tai, Y. T., Lee, S., Niloff, E. et al. (1998). BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 16, 2583-90.
- Taylor, W. R., Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-15.
- Tournigand, C., Andre, T., Achille, E. et al. (2004). FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22, 2, 229-37.
- van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M. et al. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Diff* 9, 1031-42.
- Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E. et al. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to the Bax and p53 status. *Int J Cancer* 98, 4, 498-504.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 9, 527-32.
- Wagener, C., Bargou, R. C., Daniel, P. T. et al. (1996). Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer* 67, 138-41.
- Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W. et al. (1996). Uncoupling of S phase and S

- phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 381, 713-16.
- Wang, K., Yin, X. M., Chao, D. T. et al. (1996). Bid: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10, 2859-69.
- Weissburger, J. H., Wynder, E. L. (1987). Etiology of colorectal cancer with emphasis on mechanism of action and prevention. Important advances in oncology. DeVita, V. T., Hellmann, S., Rosenberg, S. A. Philadelphia: J. B. Lippincott, 197.
- Weyrer, K., Feichtinger, H., Haun, M. et al. (1996). p53, Ki-ras, and DNA ploidy in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Lab Invest* 74, 279-89.
- Wieder, T., Essmann, F., Prokop, A. et al. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97, 5, 1378-87.
- Wu, G. S., El-Deiry, W. S. (1996). Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or bcl-2. *Clin Cancer Res* 2, 623-33.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H. et al. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin dependent kinases. *Nature* 366, 6456, 701-4.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-32.
- Zeng, Z. S., Sarkis, A. S., Zhang, Z. F. et al. (1994). p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymphnode positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 12, 10, 2043-50.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AgNO ₃	Silbernitrat
AIO	Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie
ANT	Adeninnukleotidtransporter
APS	Ammoniumpersulfat
ARO	Arbeitsgemeinschaft für Radiologische Onkologie
ATP	Adenosintriphosphat
BH-Domäne	Bcl-2 Homologie-Domäne
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAO	Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Onkologie
CARD	Caspasenrekrutierungsdomäne
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
CRC	kolorektales Karzinom
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DD	<i>death domain</i>
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DNA	Desoryribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Poliposis
FI	Färbeindex
FLIP	Fas-linked inhibitory protein
5-FU	5-Fluoruracil
g	Gramm
G	Guanin
h	<i>hour</i>
HCl	Hydrochlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom
HSP	<i>heat shock protein</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>

Ig	Immunglobulin
JÜR	Jahresüberlebensrate
k	kilo
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
Mut	Mutation
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NH ₄	Ammoniumhydrochlorid
nm	Nanometer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
upm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SMAC	<i>second mitochondrial activator of apoptosis</i>
SOD	<i>silencer of death domain</i>
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i>
T	Thymin
TAE	Trishydroxymethylaminomethan-Acetat-EDTA
TAF	<i>TATA-box-binding protein-associated factor</i>
TBE	Trishydroxymethylaminomethan-Borat-EDTA
TBS	Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid-Natriumchlorid
TEMED	N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNM	<i>tumor node metastasis</i>
U	<i>units</i>
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
V	Volt
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Ich erkläre, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 24.06.2004

(Unterschrift)